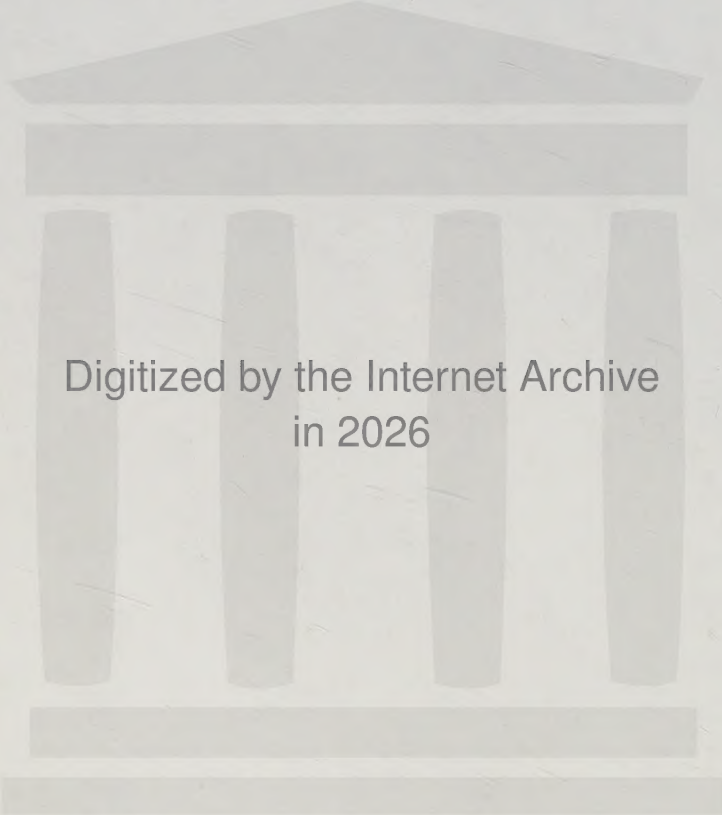


**ERZEUGUNG
MONOKLONALER UND POLYKLONALER ANTIKÖRPER
UND IHRE ANWENDUNG IN
IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNGSVERFAHREN
FÜR TROPANALKALOIDE**

JÜRGEN WACHSMUTH



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0094

ERZEUGUNG
MONOKLONALER UND POLYKLONALER ANTIKÖRPER
UND IHRE ANWENDUNG IN
IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNGSVERFAHREN FÜR TROPANALKALOIDE

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwigs-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Jürgen Wachsmuth
aus
Darmstadt

Februar 1987

1. Referent: Prof. Dr. M. H. Zenk

2. Referent: Doz. Dr. M. Wink

Tag der mündlichen Prüfung: 25.2.1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	12
1. Pflanzliches Material	12
1.1. Herkunft und Anzucht	12
1.2. Herkunft von Herbarmaterial	12
1.3. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	13
2. Kulturtechniken für pflanzliche Zellkulturen .	14
2.1. Herkunft der Zellkulturen	14
2.2. Medien	14
2.3. Sterilisationsverfahren	14
2.4. Anlage und Kultivierung von Kallus- kulturen	15
2.5. Anlage und Kultivierung von Suspensions- kulturen	15
2.6. Aufarbeitung von Zellkulturmaterial	16
3. Kulturtechniken für pflanzliche Organkulturen	16
3.1. Herkunft der Wurzelkulturen	16
3.2. Medien	16
3.3. Sterilisationstechniken	17
3.4. Anlage und Kultivierung von Wurzel- kulturen	17
3.6. Aufarbeitung von Wurzelmaterial	18
4. Reagenzien	20
4.1. Chemikalien	20
4.2. Lösungen	21
5. Geräte	22
6. Gewinnung zellfreier Proteinextrakte	24
7. Chromatographische Verfahren	24
7.1. Dünnschichtchromatographie	24
7.2. Gaschromatographie (GLC)	25
7.3. Säulenchromatographie zur Molekularge- wichtsbestimmung von Proteinen	26
8. Synthese von 6 β -Hydroxyhyoscyamin	26
9. Produktion von polyklonalen Antikörpern	27

9.1. Immunisierung und Gewinnung der Antiseren	27
9.2. Isolierung der Antikörper	28
10. Erzeugung von monoklonalen Antikörpern	29
10.1. Immunisierung und Kontrolle der Antikörper- pertiter im Serum	29
10.2. Tierische Zellkulturen und Medien	30
10.3. Kultivierung von Myelom- und Hybridom- zellkulturen	32
10.4. Durchführung der Fusion	33
10.5. Selektion der Hybridomzellen	34
10.6. Gewinnung von Antikörpern	36
10.6.1. Antikörperproduktion durch <u>in vitro</u> -Kulturen	36
10.6.2. Antikörperproduktion <u>in vivo</u>	36
10.7. Bestimmung der Immunglobulinklassen	36
11. Durchführung der Radioimmuntests für Tropan- alkaloide	38
12. Durchführung der Enzymimmuntests für Tropan- alkaloide	39
12.1. Beschichten von Mikrotiterplatten mit Protein A	39
12.2. Ablaufschema des Enzymimmuntests	39
13. Berechnung der Ergebnisse immunologischer Be- stimmungsverfahren	40

III. E R G E B N I S S E

1. Radioimmuntest für Hyoscyamin	42
1.1. Synthese von ^3H -Hyoscyamin und ^{14}C -Hyos- cyamin	42
1.2. Darstellung von Hyoscyamin-Konjugaten zur Gewinnung spezifischer Antikörper ...	46
1.3. Wahl geeigneter Testbedingungen	50
1.4. Standardisierung des Testverfahrens	54
1.5. Spezifität des Testverfahrens	56
1.5.1. Kreuzreaktionen	56
1.5.2. Parallelität von Extraktverdün- nungs- und Standardkurven	60
2. Enzymimmuntest für Scopolamin	61
2.1. Testprinzip des Enzymimmuntests	61

2.2. Herkunft der spezifischen Antikörper gegen Scopolamin	63
2.3. Synthese des enzymmarkierten Scopolamin-derivates	63
2.4. Wahl geeigneter Testbedingungen	64
2.5. Standardisierung des Testverfahrens	67
2.6. Spezifität des Testverfahrens	68
2.6.1. Kreuzreaktionen	68
2.6.2. Parallelität von Extraktverdünungs- und Standardkurve	69
2.6.3. Korrelation der Ergebnisse von Enzymimmuntest und Radioimmuntest für Scopolamin	70
3. Enzymimmuntest für Hyoscyamin	71
3.1. Darstellung von enzymmarkierten Hyoscyamin-derivaten	71
3.2. Wahl geeigneter Testbedingungen	71
3.3. Standardisierung des Testverfahrens	73
3.4. Kreuzreaktionen	75
4. Zusammenfassung der wichtigsten Testparameter	77
5. Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen Atropin	81
5.1. Darstellung des Atropin-BSA-Konjugates ..	81
5.2. Verlauf der Immunantwort im Serum	81
5.3. Test der Zellkulturüberstände auf Antikörper der gewünschten Spezifität	83
5.4. Protokoll zur Durchführung der Fusion von Milz- und Myelomzellen	88
5.5. Eigenschaften der gewonnenen Antikörper ..	92
5.5.1. Bestimmung der Immunglobulinklassen ..	92
5.5.2. Vergleich der Affinitäten	94
5.5.3. Bestimmung der Antikörpertiter nach <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Kultivierung der Hybridomzellen	95
5.6. Verwendung der monoklonalen Antikörper im Enzymimmuntest für Hyoscyamin	97
5.6.1. Wahl geeigneter Testbedingungen ..	97
5.6.2. Standardisierung des Tests	97
5.6.3. Kreuzreaktionen	98
5.6.4. Vergleich mit anderen Immuntests für Hyoscyamin	100
6. Untersuchungen zum Vorkommen der Tropasäureester in differenzierten Pflanzen	101
6.1. Tropasäureester in Herbarmaterial von <u>Solanaceen</u> -Arten	101

6.2. Vorkommen von Tropasäureestern in anderen Gattungen des Pflanzenreichs	112
6.3. Tropanalkaloide in Pflanzen verschiedener <u>Solanaceen</u> -Arten	115
6.4. Tropanalkaloide in Populationen einzelner <u>Solanaceen</u> -Arten	117
6.5. Tropanalkaloide in Einzelpflanzen verschiedener <u>Solanaceen</u> -Arten	121
7. Vorkommen von Tropanalkaloiden in pflanzlichen Zellkulturen	127
7.1. Untersuchung von Kalluskulturen verschiedener <u>Solanaceen</u> -Arten	127
7.2. Untersuchung von Suspensionskulturen	129
8. Vorkommen von Scopolamin in Organkulturen verschiedener <u>Solanaceen</u> -Arten	130
9. Untersuchungen zur Optimierung des Gehalts an Scopolamin in der Wurzelkultur	134
9.1. Einfluß verschiedener Medien	134
9.2. Einfluß von Veränderungen des Mediums ...	138
9.2.1. Auswirkungen verschiedener Saccharosekonzentrationen	138
9.2.2. Auswirkungen verschiedener pH-Werte	139
9.2.3. Auswirkungen von Pflanzenhormonen	140
9.2.4. Auswirkungen verschiedener Alkaloidvorstufen	144
9.3. Einfluß von Veränderungen der Kulturbedingungen	146
10. Selektion varianter Wurzelkulturen mit hohem Scopolamingehalt aus einer Wurzelkultur von <u>Hyoscyamus niger</u>	147
10.1. Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts in einer Wurzelkultur von <u>H. niger</u>	147
10.2. Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts in Subkulturen einer Wurzelkultur von <u>Hyoscyamus niger</u>	149
10.3. Untersuchung des Scopolamingehalts der Subkulturen von <u>Hyoscyamus niger</u> Hn 61 über mehrere Kulturperioden	150
11. Untersuchung der Wurzelkultur <u>Hyoscyamus niger</u> Hn 61 auf Hinweise für eine Transformation durch <u>Agrobacterium rhizogenes</u>	160

12.	Untersuchungen zum Alkaloidgehalt in einzelnen Wurzeln der Kultur <u>Hyoscyamus niger</u> Hn 61/11.2	162
12.1.	Vergleich von Alkaloidgehalten in der Hauptwurzel und ihren Verzweigungen	162
12.2.	Untersuchung der Alkaloidverteilung entlang der Längsachse der Wurzeln	165
13.	Untersuchung der Biotransformation zugesetzter Tropanalkaloide durch eine Wurzelkultur von <u>Hyoscyamus niger</u>	169
13.1.	Biotransformation der Alkaloide Hyoscyamin, Atropin, 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Dehydrohyoscyamin ¹⁴	169
13.2.	Biotransformation von ¹⁴ C-Hyoscyamin in der Wurzelkultur des <u>Hyoscyamus niger</u> -Stammes Hn 61	172
13.3.	Biotransformation von ¹⁴ C-Hyoscyamin in <u>Duboisia</u> -Pflanzen	177
13.4.	Identifizierung von 6 β -Hydroxyhyoscyamin	178
13.5.	Untersuchung der Rolle von 6 β -Hydroxyhyoscyamin in der Biosynthese von Scopolamin	185
13.6.	Untersuchung der Rolle von Dehydrohyoscyamin in der Biosynthese von Scopolamin	190
14.	Nachweis der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase in der Wurzelkultur des <u>H. niger</u> -Stammes Hn 61/11.2 .	196
IV.	DISKUSSION	200
V.	ZUSAMMENFASSUNG	221
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	224

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
AZA	Azaguanin (Medienzusatz, s.S. 31)
B, B ₀	Größen bei der Auswertung immunologischer Bestimmungsverfahren (s.S. 40)
BSA	Rinderserumalbumin
CFA	Komplettes Freundesches Adjuvans
cpm	Impulse pro Minute (Radioaktivitätsmessung)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Medienzusatz, s.S. 31)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid·HCl
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (= Festphasenenzymimmuntest)
FCS	Fötales Kälberserum
FG	Frischgewicht
HAT, HT	Medienzusätze (s.S. 31)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
KR	Kreuzreaktion
min	Minute(n)
MS	Massenspektrum
MW	Mittelwert
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
RAM	Rabbit-Anti-Mouse-Antikörper
RIA	Radioimmuntest
RPMI	Zellkulturmedium (s.S. 31)
sd	Standardabweichung
TBS	Trisgepufferte physiologische Kochsalzlösung
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UB	Unspezifische Bindung (s.a. S. 40)
Upm	Umdrehungen pro Minute

I. E I N L E I T U N G

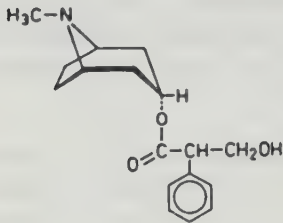
Als in den Jahren um 1560 die Spanier die ersten Kartoffeln aus Südamerika brachten, glaubte niemand in Europa an den Wert dieser Pflanzen. Nur als eine der vielen märchenhaften Beschreibungen des Lebens in diesen fernen Ländern nahm man den Bericht auf, es handle sich um eines der Grundnahrungsmittel im Inkareich (BURTON, 1967).

Der zweifelhafte Ruf der Pflanzenfamilie der Solanaceen hatte seine Gründe. Vertreter der Gattungen Atropa, Datura, Hyoscyamus und Mandragora waren als Gift- und Zauberpflanzen lange bekannt. Der griechische Wissenschaftler Theophrast (geb. 372 v. Chr.) beschreibt das Ritual der Ausgrabung einer Alraunenwurzel (nach WAGNER, 1970), und Shakespeare läßt Hamlets Vater durch den Saft des Bilsenkrauts sterben (SHAKESPEARE, 1602). Der Hexenkult des Mittelalters beruhte z.T. auf den Halluzinationen im Verlauf einer Vergiftung mit Solanaceen-Drogen, die wichtiger Bestandteil von "Hexensalben" waren (RICHTER, 1960; WAGNER, 1970).

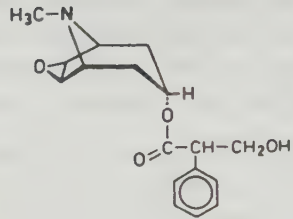
In enger Beziehung dazu stand der Gebrauch als Arzneimittel, der seit dem frühen 16. Jahrhundert schriftlich dokumentiert ist (CORDELL, 1981), sicherlich aber schon sehr viel länger zum Erfahrungsschatz der Heilkundigen gehörte.

Im Jahr 1820 begann mit der "Isolation einer basischen Substanz mit starker mydriatischer Wirkung" aus Atropa bella-donna (RUNGE, 1820; 1824) die Entwicklung der Chemie der Tropanalkaloide. Als erstes Alkaloid wurde Atropin kristallisiert und beschrieben (MEIN, 1833; GEIGER und HESSE, 1833a,b), seine Konstitution aufgeklärt und die Totalsynthese durchgeführt (WILLSTÄTTER, 1897; 1898; 1901; 1903). Die Beschreibungen des Hyoscyamins (GEIGER, 1833), des Scopolamins (LADENBURG, 1881; HESSE, 1892) und anderer Alkaloide folgten. Im Jahr 1922 war auch die Konstitution des Scopolamins bekannt (HESS und WAHL, 1922). Die Aufklärung der

Stereochemie und der absoluten Konfiguration der Tropanalkaloide folgte (vgl. Übersichtsartikel von FODOR, 1960; 1967; LINDENMANN, 1961).



Hyoscyamin



Scopolamin

Abb. 1: Strukturformeln

In der Pflanze liegen Hyoscyamin, Scopolamin und andere Tropanalkaloide in optisch aktiver Form als Ester des Alkamins mit L-Tropasäure vor. Diese Enantiomere sind gemeint, wenn in der vorliegenden Arbeit Alkaloidnamen ohne Kennzeichnung der optischen Aktivität verwendet werden. Atropin bezeichnet das Razemat von D- und L-Hyoscyamin. Auf FODOR und NADOR (1953) geht die Nomenklatur zurück, die die Stellung von Substituenten am Tropanringsystem beschreibt. In β -Stellung befinden sich die Liganden, die auf derselben Seite der generellen Ringebene stehen wie das Stickstoff-Brückenatom. Die α -Stellung bezeichnet die entgegengesetzten Positionen.

Mit der Aufklärung der Struktur kam es zu ersten Spekulationen über die mögliche Biosynthese der Tropanalkaloide. Die Synthese des Tropinons aus Succindialdehyd (ROBINSON, 1917) lief unter "physiologischen" Bedingungen ab und schien auf eine ähnliche Reaktion in der Pflanze hinzudeuten (SCHÖPF *et*

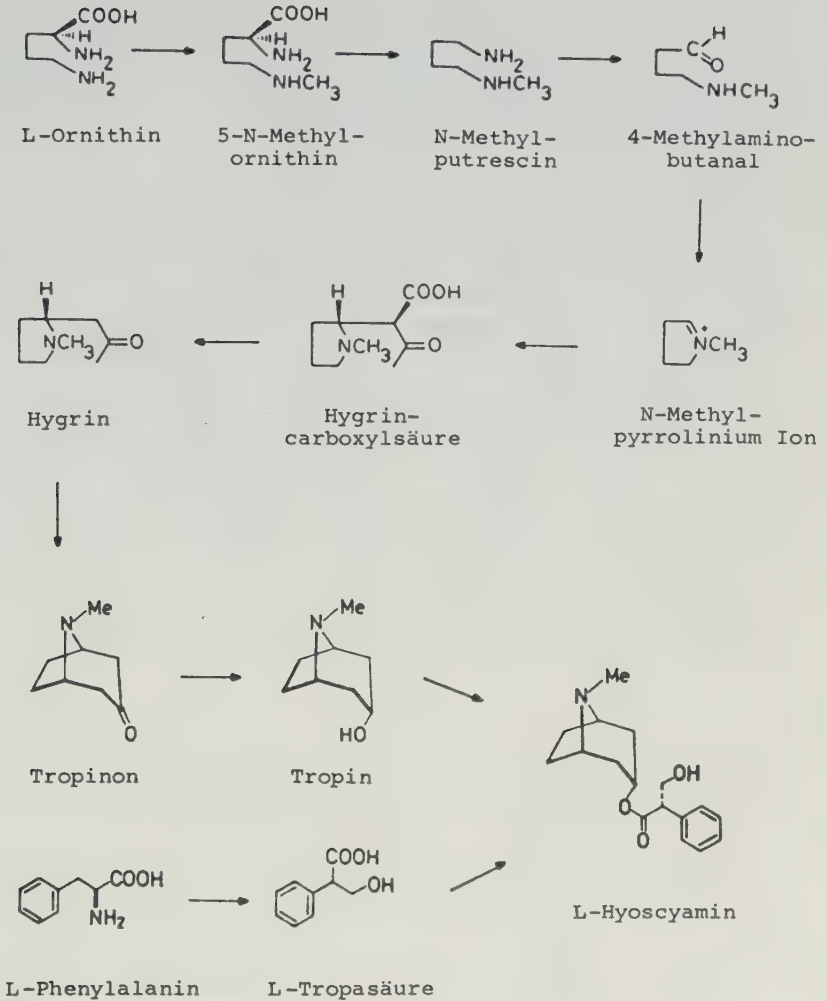


Abb. 2: Vorschlag zum Verlauf der Biosynthese von Hyoscyamin nach LIEBISCH und SCHÜTTE (1985).

al., 1937). Auf der anderen Seite wurden die Aminosäuren Arginin, Ornithin und Putrescin als Vorstufen des Tropangerüsts vorgeschlagen (CROMWELL, 1943; JAMES, 1950). Tropenol sollte dann das zentrale Intermediat sein, aus dem sich die verschiedenen Alkamine ableiten ließen.

Diese Hypothesen konnten überprüft werden, als in den fünfziger Jahren erstmals radioaktiv markierte Formen von organischen Molekülen zur Verfügung standen. Ein früher Versuch mit ^{14}C -Ornithin erwies den Einbau in Hyoscyamin (LEETE et al., 1954). Weitere Ergebnisse folgten und belegten die Biosynthese des Tropangerüsts aus Azetat (KACZKOWSKI et al., 1961) und einem Ornithin-Molekül, das orientiert eingebaut wird (LEETE, 1962; BOTHNER-BY et al., 1962; LIEBISCH et al., 1969; O'DONOVAN und KEOGH, 1969; AHMAD und LEETE, 1970). Für die Herkunft der Tropasäure wurde früh der Terpenstoffwechsel vorgeschlagen. Fütterungsexperimente mit verschiedenen Formen markierten Phenylalanins bewiesen eine intramolekulare Umlagerung zu L-Tropasäure durch Wanderung der Carboxylgruppe (LEETE, 1960; LEETE und LOUDON, 1961; 1966; LOUDON und LEETE, 1962a; 1962b; GIBSON und YOUNKEN, 1967; LIEBISCH et al., 1972; LEETE et al., 1975).

Weitere Ergebnisse brachte die Untersuchung der Bildung des Epoxidrings im Scopolamin. Schon mit unmarkierten Alkaloiden fanden ROMEIKE (1956; 1959) und FODOR et al. (1959) die Oxidation von Hyoscyamin und Dehydrohyoscyamin zu Scopolamin. ^{14}C -Hyoscyamin wurde in 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin eingebaut. Auch das isolierte 6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde von der Pflanze in Scopolamin umgewandelt (ROMEIKE, 1960b; ROMEIKE und FODOR, 1960). Der umgekehrte Weg von Scopolamin zu Hyoscyamin wurde in diesen Arbeiten ausgeschlossen, für die in vivo-Umsetzung von N-Methyl- ^{14}C -Scopolamin in Datura innoxia aber gefunden (VERZAR-PETRI et al., 1974). Das Syntheseprodukt Dehydrohyoscyamin wurde in pflanzlichem Material bisher nicht nachgewiesen. Seine Rolle im Biosyntheseweg blieb daher hypothetisch.

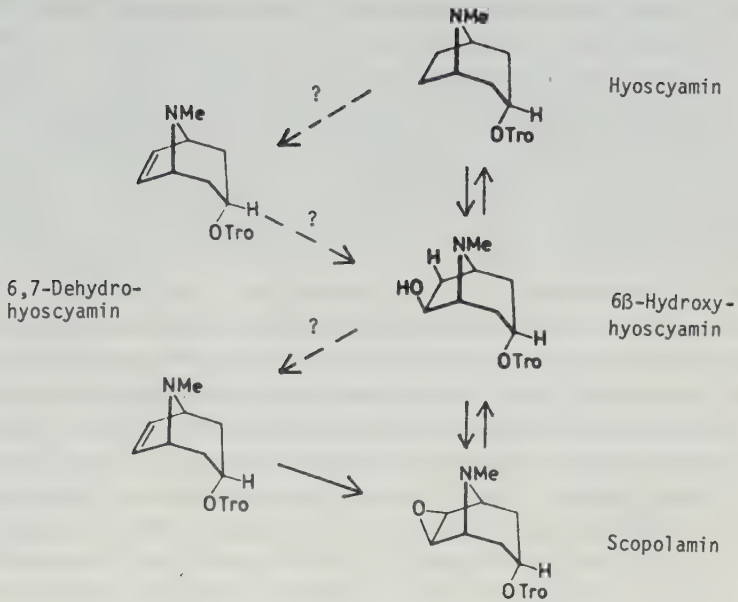


Abb. 3: Vorstellungen zur Biosynthese von Scopolamin

Trotz der Identifizierung von Vorstufen der Tropanalkaloide durch in vivo-Experimente ist über die entsprechenden Enzymsysteme der Pflanze wenig bekannt. Drei Enzyme der Nikotinbiosynthese, eine Ornithindecaboxylase, eine Putrescin-N-methyltransferase und eine N-Methylputrescinoxidase, die bei Nicotiana tabacum die Bildung des N-Methylpyrrolinium-Ions bewirken, wurden auch in Datura und Atropa nachgewiesen (vgl. Übersichtsartikel von LEETE, 1975). Angesichts des orientierten Einbaus von Ornithin in Hyoscyamin bleiben jedoch viele Fragen offen. Gefunden wurde eine Atropinesterase (JINDRA, 1960; KITAMURA, 1985), die auch für die Veresterung

von Tropin und Tropasäure verantwortlich sein soll (JINDRA und STABA, 1968). Gereinigt und charakterisiert wurde nur die Tropindehydrogenase (KOELEN und GROSS, 1982).

Von den mehr als 60 bisher bekannten Tropanalkaloiden haben Atropin und Scopolamin Bedeutung für die pharmazeutische Industrie. Atropin wird wegen seiner parasympholytischen Wirkung u.a. bei Spasmen der glatten Muskulatur, z.B. in der Folge von Koliken, zur Narkosevorbereitung, in der Augenheilkunde und als Antidot bei Vergiftungen mit Acetylcholinesterasehemmstoffen wie dem Insektizid E 605 verwendet. Scopolamin hat ähnliche pharmakologische Wirkungen (MUTSCHLER, 1986). Ein Nachteil der Alkaloide ist ihr breites Spektrum an Effekten auf den Organismus. Neue Entwicklungen wie die Arzneiform des Transdermalen Therapeutischen Systems für Scopolamin als Antiemetikum können Nebenwirkungen zurückdrängen (HAMMER, 1986). Am häufigsten verwendet werden aber partialsynthetische Derivate der Alkaloide mit deutlich verringerten Nebenwirkungen, die als Spasmolytika (Buscopan, Spasmex) und Antiasthmatica (Atrovent, Ventilat) unersetzlich sind (EHRHARDT und RUSCHIG, 1972).

Der Einsatz in der Medizin führt zu einem hohen Bedarf an Tropanalkaloiden. Die Totalsynthese ist unwirtschaftlich, sodaß Pflanzenmaterial aus landwirtschaftlichem Anbau den einzigen verwendbaren Rohstoff darstellt (WAGNER, 1980). Ein Problem ergibt sich aus der Tatsache, daß in den meisten Drogenmaterialien Atropin einen großen Teil des Gesamtalkaloidgehalts ausmacht, während für Scopolamin ebenfalls ein hoher Bedarf besteht. Sein vierfach höherer Verkaufspreis belegt dies (MERCK, 1985).

Eine Alternative zur traditionellen Gewinnung könnte die Nutzung biotechnologischer Produktionsmethoden sein. Die Verwendung pflanzlicher Zellkulturen für die industrielle Produktion ihrer Inhaltsstoffe wird seit langem erwogen (ROUTIER und NICKELL, 1956; ZENK et al., 1975), wegen vielfältiger Schwierigkeiten blieb es jedoch bei wenigen Anwen-

dungen (FOWLER, 1986). Bei Pflanzenzellkulturen beträgt die Zeit für die Verdopplung der Biomasse ein bis drei Tage, bei Mikroorganismen nur knapp eine Stunde. Dadurch entstehen hohe Kosten für lange Prozeßzeiten, die durch den Wert des Produkts gerechtfertigt sein müssen. Dies träfe sicherlich auf einige Substanzen wie die cytostatisch wirksamen Indolalkaloide Vincristin und Vinblastin oder das Tropanalkaloid Scopolamin zu. Bisher lag aber in Pflanzenzellkulturen gerade der Gehalt solcher Stoffe stets weit unter dem Niveau in der intakten Pflanze.

Zur Begründung wurde angenommen, die Biosynthese der pflanzlichen Sekundärstoffe sei in vielen Fällen an einen Entwicklungszustand der differenzierten Pflanzenzelle gekoppelt (WIERMANN, 1981; ZENK, 1982; LUCKNER und DIETRICH, 1984). Gestützt wurde diese Hypothese durch Beobachtungen, daß aus Zellkulturen ohne Alkaloidproduktion regenerierte Pflanzen und differenzierte Gewebe wieder das bekannte Alkaloidspektrum aufwiesen (RAJ BHANDARY et al., 1972; TABATA et al., 1972; HIRAOKA und TABATA, 1974). Darüberhinaus berichteten GARVE et al. (1985), daß in Zellkulturen von Digitalis lanata die Fähigkeit zur Biosynthese von Herzglykosiden mit dem Einsetzen der Embryogenese einherging.

Nachdem Wurzelkulturen mit gutem Wachstum und den Inhaltsstoffen der ganzen Pflanze beschrieben waren (BUTCHER und STREET, 1964, und darin zitierte Literatur), schlugen METZ und LANG (1964) ein Verfahren zur Züchtung von Wurzelgewebe in Suspensionskultur vor. Kommerzielle Anwendung fand es jedoch nicht (METZ, pers. Mitteilung).

Auf dem Gebiet der Tropanalkaloide wurden große Anstrengungen unternommen, eine geeignete Gewebekultur zu finden. Zusammenfassend mußte jedoch immer wieder festgestellt werden, daß der Alkaloidgehalt in den Zellen viel geringer als in der differenzierten Pflanze war (CORDUAN, 1975; KURZ und CONSTABEL, 1985). Diese Tatsache beeinflusste auch den Versuch, hochproduzierende Zellstämme durch Nutzung der soma-

klonalen Variation in einer Population zu selektieren (OKSMAN-CALDENTLEY und STRAUSS, 1986). Weitaus höher lagen die Alkaloidgehalte von Wurzelkulturen verschiedener Arten aus den Gattungen Atropa (WEST und MIKA, 1957; MITRA, 1972), Datura (FRENCH und GIBSON, 1957), Duboisia (YAMADA und ENDO, 1984) und Hyoscyamus (METZ und LANG, 1964; HASHIMOTO und YAMADA, 1983; HASHIMOTO et al., 1986). Die Bedingungen für eine industrielle Anwendung waren jedoch nie gegeben.

In der letzten Zeit richtete sich das Augenmerk auf die Transformation pflanzlicher Zellen mit Agrobacterium rhizogenes (WHITE und NESTER, 1980; CHILTON et al., 1982; TEPFER, 1984). So induzierte Wurzeln zeichnen sich durch rasches Wachstum (SPANIO et al., 1981; TANAKA et al., 1985) und die Produktion von Inhaltsstoffen der verwendeten Pflanze aus. Für die ersten Wurzelkulturen, die auf diese Weise angelegt wurden, konnte bereits die Produktion von Tropanalkaloiden nachgewiesen werden (FLORES und FILLNER, 1985; FLORES et al., 1986; MANO et al., 1985; KAMADA et al., 1986).

Eine weitere Entwicklung ist die Ausnutzung pflanzlicher Zellkulturen für die Biotransformation zugesetzter Substanzen. Ein bekanntes Beispiel ist die Hydroxylierung von β -Methyldigitoxin durch Gewebekulturen von Digitalis lanata, die schon im 200 l-Maßstab gelang (REINHARD und ALFERMANN, 1980; ALFERMANN et al., 1984). Auch die Reinigung eines Enzyms aus einer Kultur und seine Verwendung in immobilisierter Form für eine Umsetzung sind durchgeführt worden (PFITZNER und ZENK, 1982). Als mögliche Zukunftsperspektive erscheint die Übertragung der Biosynthesewege in Mikroorganismen mit den Mitteln der Gentechnik. Klonieren ließen sich natürlich nur die Nukleotidsequenzen der Enzyme, die für die Biosynthese der gesuchten Pflanzeninhaltsstoffe verantwortlich sind. Heute fehlt noch für fast alle pharmazeutisch bedeutenden Sekundärmetaboliten das notwendige Wissen über die enzymatischen Grundlagen ihrer Bildung und deren Regulation. In absehbarer Zukunft erfolgversprechend scheint dieser Weg daher nur für Reaktionen über einen oder zwei Schritte zu sein (TYLER, 1986).

Eine sinnvolle Anwendung dieser Techniken wäre die Umwandlung von Hyoscyamin in Scopolamin, die mit den Mitteln der organischen Chemie bei vertretbarem Aufwand nicht möglich ist. In Versuchen mit radioaktiv markiertem Hyoscyamin wurde diese Umsetzung sowohl für Zellkulturen (STOHS, 1969) als auch für isolierte Wurzeln (ROMEIKE, 1960c) gezeigt. Bei Versuchen mit Hyoscyaminkonzentrationen im Bereich von 10^{-3} M zeigten sich in Zellkulturen nur Spuren von Scopolamin, und in Wurzelkulturen lagen die Umsätze bei höchstens 12% (HASHIMOTO und YAMADA, 1983). Für die in vitro-Verfahren fehlt bisher das als Grundlage notwendige Wissen über die Enzymatik der Scopolaminbiosynthese.

Die vorgestellten Arbeiten zeigen, daß bis heute die Fähigkeiten der Zell- und Organkulturen von Solanaceen-Arten zur Produktion oder Biotransformation von Tropanalkaloiden für die industrielle Nutzung nicht ausreichen.

Die Selektion von geeignetem Pflanzenmaterial und die Verbesserung der Kulturbedingungen sind Möglichkeiten, günstigere Produktionsbedingungen zu erreichen. Die analytischen Verfahren sind wesentliche Voraussetzung solcher Arbeiten. Mehrere Anforderungen müssen hier erfüllt werden: Die Methoden sollten aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit bei geringen Probenmengen anwendbar sein, ihre hohe Spezifität muß die Messung in ungereinigten Rohextrakten erlauben, und große Probenzahlen sollten durch einfache Handhabung in kurzer Zeit bewältigt werden.

Diese Bedingungen werden durch immunologische Bestimmungsverfahren erfüllt. Der Radioimmuntest (BERSON und YALOW, 1959) vereinigt die hohe Spezifität der Antigen-Antikörper-Reaktion mit der hohen Empfindlichkeit der Radioaktivitätsmessung. Diese Technik bewährte sich auf dem Gebiet der klinischen Chemie, wie die rasch ansteigende Zahl der Anwendungen zeigte (vgl. Übersicht bei YALOW, 1978). Die Markierung mittels radioaktiver Isotope brachte neben den erwähn-

ten Vorteilen auch einige Schwierigkeiten mit sich. Insbesondere die Entwicklung von Tests für individuelle Anwendungen wurde durch die notwendigen Umgangsgenehmigungen und die zunehmend schwieriger werdende Entsorgung radioaktiven Abfalls erschwert.

Immer häufiger ersetzt man daher andere Markierungen der radioaktiven Isotope, wobei Verfahren wie der Fluoreszenzimmuntest, der Spinimmuntest und der Bakteriophagenimmuntest entwickelt wurden (vgl. Übersicht bei VOGT, 1978). Die weitaus größte Bedeutung erlangte der Enzymimmuntest, den gleichzeitig ENGVALL und PERLMANN (1971) und VAN WEEMEN und SCHUURS (1971) erarbeiteten.

Seit 1976 werden immunologische Bestimmungsverfahren auch für phytochemische Fragestellungen eingesetzt (WEILER und ZENK, 1976). Die Zahl der Anwendungen stieg rasch, und auch der Enzymimmuntest eignete sich für einige dieser Verfahren (vgl. die Übersichtsartikel von WEILER 1983; 1984).

Die verwendeten polyklonalen Antiseren standen stets nur in beschränkter Menge zur Verfügung, und ihre Eigenschaften wechselten von Charge zu Charge. Einen Ausweg bot hier die Entdeckung von KÖHLER und MILSTEIN (1975). Ihnen gelang durch Verschmelzung eines immunkompetenten Lymphozyten mit einer "unsterblichen" Myelomzelle die unbegrenzte in vitro-Produktion von Antikörpern einer bestimmten Spezifität. Durch den Einsatz der so gewonnenen monoklonalen Antikörper können immunologische Bestimmungsverfahren über lange Zeit unter standardisierten Bedingungen verwendet werden. Die erhaltenen Ergebnisse bleiben vergleichbar. Außerdem verbesserte der Einsatz monoklonaler statt polyklonaler Antikörper häufig die Parameter der Testverfahren. Eine Senkung der Nachweisgrenze bei gleichzeitiger Erhöhung der Präzision der Ergebnisse konnte beobachtet werden (MERTENS, 1985).

Für Tropanalkaloide wurden bereits immunologische Bestimmungsverfahren beschrieben. WEILER et al. (1981b) entwickelten einen Radioimmuntest für Scopolamin, dessen Eignung für

phytochemische Untersuchungen gezeigt werden konnte. Mehrere Arbeiten befaßten sich mit der Aufstellung eines Radioimmuntests für Atropin, der auch zur Messung von Hyoscyamin in Pflanzenextrakten eingesetzt wurde (FASTH et al., 1975; WURZBURGER et al., 1977; VIRTANEN et al., 1980; LEHTOLA et al., 1982).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, immunologische Bestimmungsverfahren für Tropanalkaloide zu erarbeiten. Die Tests sollten für die quantitative Analyse großer Probenzahlen ausgelegt sein und die Messung in ungereinigten Extrakten ohne weitere Vorbehandlung ermöglichen. Dabei sollten die Vorteile der Technik des Enzymimmuntest und der Verwendung monoklonaler Antikörper genutzt werden.

Diese Möglichkeit zur Quantifizierung des Alkaloidgehaltes sollte zur Untersuchung von differenzierten Pflanzen dienen, die zur Synthese von Tropanalkaloiden fähig sind. In Experimenten mit Zell- und Wurzelkulturen wurde die Auswahl einer Kultur angestrebt, die das Tropanalkaloid Scopolamin als letztes Glied einer Biosynthesekette in hoher Ausbeute produziert. Die Testverfahren sollten dann die Optimierung der Kulturbedingungen und die Selektion von Kulturen höheren Gehalts begleiten.

An der ausgewählten Kultur sollten Versuche zur Biosynthese und Biotransformation von Hyoscyamin und Scopolamin durchgeführt werden. Außerdem ergab sich im Verlauf der Arbeiten die Möglichkeit, an einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger somaklonale Variation in Hinblick auf den Alkaloidgehalt nachzuweisen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Pflanzliches Material

1.1. Herkunft und Anzucht

Das Samenmaterial der verschiedenen Solanaceen-Arten wurde von Botanischen Gärten und Instituten in aller Welt erbeten. Die Samen wurden im Gewächshaus bei einer konstanten Temperatur von 20-22°C und 60-80% relativer Luftfeuchtigkeit ohne künstliche Beleuchtung zur Keimung gebracht. Die ca. 2 cm großen Keimlinge wurden in Kunststofftöpfen pikiert und unter den genannten Bedingungen gezogen.

Für Freilanduntersuchungen erfolgte nach sechs Wochen die Auspflanzung in einem Versuchsfeld.

Für die Anlage von Hydrokulturen wurde nach drei Wochen die an den Pflänzchen haftende Erde durch Spülen mit Leitungswasser entfernt. Die Pflanzen wurden dann in gegitterten, mit Blähton gefüllten Kunststofftöpfen gezogen, die von der Nährstofflösung (Blütenborn, Fa. Thompson, Düsseldorf) umgeben waren. Im Gewächshaus herrschten die oben genannten Bedingungen.

Pflanzen des Hybrids von Duboisia myoporoides R.Br. x Duboisia leichardtii F.Muell. stammten aus Australien und wurden seit Jahren im Gewächshaus kultiviert.

Frau Hirschmann, Herrn Meier und Herrn Nagy sei hier herzlich für die Anzucht der Pflanzen gedankt.

1.2. Herkunft von Herbarmaterial

Die Untersuchung von Herbarmaterial wurde von Prof. Grau ermöglicht, der dankenswerterweise in die Entnahme von Blattfragmenten aus den Herbarbögen des Staatsherbars München einwilligte. Für die Überlassung von Proben weiterer Arten sei

Dr. Kallunki vom New York Botanical Garden und Dr. Kittredge von den Harvard University Herbaria gedankt.

1.3. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Von jeder Freilandpflanze wurde für die Untersuchung das jüngste voll entwickelte Blatt und ein mittelgroßes, älteres Blatt abgenommen. Die Blätter wurden in der Längsrichtung halbiert. Ein Teil wurde mit 5,0 ml Methanol 80% extrahiert, der andere diente zur Bestimmung des Trockengewichts.

Für die Untersuchung der Alkaloidverteilung in einer Pflanze wurde diese von anhaftendem Blähton bzw. Erde durch kurzes Spülen mit Leitungswasser befreit. Dann erfolgte sofort die Zergliederung in die untersuchten Teile. Die Extraktion erfolgte mit 5,0 ml Methanol 80%. Danach wurde jedes Teil zur Bestimmung des extrahierten Trockengewichts getrocknet.

Herbarmaterial wurde nach der Probennahme getrocknet, gewogen und bei einem mittleren Trockengewicht von 4 mg mit 1,0 ml Methanol 70% extrahiert.

Für andere Untersuchungen wurde das Pflanzenmaterial zerkleinert und mit Methanol 80% (5 ml/10-40 mg TG) versetzt.

Die Trocknung erfolgte allgemein in einem Vakuumtrockenschrank (VTR 5036, Fa. Heraeus, Osterode) bei 40°C und 10 mbar.

Die Extraktion dauerte 12 Stunden bei 40°C. Die Lösungen wurden dann auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und vor der Bestimmung der Alkaloide mit Wasser in geeigneter Weise verdünnt.

Die Bestimmung der Alkaloide erfolgte stets möglichst rasch. Die kurzzeitige Aufbewahrung der Extrakte geschah bei 4°C im Dunklen.

2. Kulturtechniken für pflanzliche Zellkulturen

2.1. Herkunft der Zellkulturen

Einige Kulturen stammten aus der Zellkultursammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München. Weitere Kulturen konnten im Rahmen dieser Arbeit neu angelegt werden (vgl. III.7.1.).

Die Kulturen der somatischen Hybride von Atropa belladonna L. x Nicotiana tabacum L. stammten von Prof. Gleba, Kiew.

2.2. Medien

Die Kalluskulturen wurden auf folgenden Medien angezogen, zu deren Verfestigung 0,8% Bacto-Agar (Fa. Difco, Detroit, USA) diente.

- | | |
|------|---|
| LS | nach LINSMAIER und SKOOG (1965) mit 10^{-6} M
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 10^{-6} M
1-Naphtylessigsäure |
| 4x | nach GAMBOURG <u>et al.</u> (1968) mit 0,2% NZ-Aminen, 10^{-5} M
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 3×10^{-6} M
Naphtylessigsäure, 3×10^{-6} M 3-Indoleessigsäure und
10^{-6} M Kinetin |
| B5CM | nach GAMBOURG <u>et al.</u> (1968) mit 0,2% NZ-Aminen, 10^{-5} M
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 200 ml/l Kokosmilch |

2.3. Sterilisationsverfahren

Medien, Glasgeräte und Sterilfilter wurden bei 121°C und 2 bar 25 Minuten lang autoklaviert. Die benutzten Autoklaven stammten von der Fa. Fedegari (Zürich, Schweiz), ein Tischautoklav von der Fa. Melag (Berlin).

Nicht hitzestabile Substanzen wurden den Medien nach dem Erkalten zugesetzt. Hierbei erfolgte die Sterilisation durch Sterilfiltration an Membranfiltern der Fa. Sartorius

(Göttingen) mit einer Porengröße von $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Radioaktiv markierte Substanzen lagen in methanolischer Lösung steril vor.

Glasgeräte konnten bei 160°C in zwei Stunden hitzesterilisiert werden. Metallgeräte wie Pinzetten und Skalpelle wurden in der Gasflamme ausgeglüht.

Für Arbeitsvorgänge unter sterilen Bedingungen standen Laminar-Air-Flow-Bänke der Firmen Flow (Meckenheim) und Babcock (Bad Hersfeld) bereit.

2.4. Anlage und Kultivierung von Kalluskulturen

Die Zellkulturen wurden aus Samenmaterial (vgl. II.1.1.) angelegt. Die Samen wurden mit einer fünfprozentigen Natriumhypochloritlösung 5 bis 30 Minuten oberflächensterilisiert, mit sterilem Wasser gespült und dann auf Festmedium nach UFFELIE (1951) oder nach LINSMAIER und SKOOG (1965) ohne Zusatz von Pflanzenwuchsstoffen zur Keimung gebracht. Die 2 cm großen Keimlinge wurden mit dem Skalpell geritzt und zur Bildung von Kallus auf verschiedene Medien übertragen.

Alle Kulturen auf festem Medium wurden im Dunklen bei 23°C und 70% relativer Luftfeuchtigkeit aufbewahrt und alle vier Wochen auf frisches Medium übertragen.

2.5. Anlage und Kultivierung von Suspensionskulturen

Suspensionskulturen entstanden durch Überführen von wenigen Gramm Kallus in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium.

Zur Erhaltung von Suspensionskulturen dienten 75 ml Medium, die in 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 30 ml Zellsuspension angeimpft wurden.

Die Suspensionskulturen wurden auf Rotationsschüttlern mit 100 Upm bei 23°C und 65% relativer Feuchte unter Dauerlicht von 650 lux gezogen. Die Kulturdauer betrug 7 bis 14 Tage.

2.6. Aufarbeitung von Zellkulturmaterial

Von Kalluskulturen wurden 1-2 Gramm Gewebe entnommen und mit 5,0 ml Methanol 80% bei 40°C 12 Stunden lang extrahiert. Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgte an einer zweiten Probe der Kultur.

Medium und Gewebe von Suspensionskulturen wurden durch Filtration getrennt. 1-2 Gramm Gewebe wurden mit 5,0 ml Methanol extrahiert, der Rest für die Trockengewichtsbestimmung verwendet. Das Medium konnte ohne Aufarbeitung für die Messung des Volumens, des pH-Wertes, der Restsaccharosekonzentration (Abbe-Refraktometer, Fa. Zeiss, Oberkochen) und des Alkaloidgehaltes eingesetzt werden.

Alle Angaben zum Saccharose- und Alkaloidgehalt des Mediums wurden für das zum Zeitpunkt des Animpfens einer Kultur vorliegende Medienvolumen berechnet.

Bei Trocknung und Alkaloidbestimmung wurde wie unter II.1.3. beschrieben vorgegangen.

3. Kulturtechniken für pflanzliche Organkulturen

3.1. Herkunft der Wurzelkulturen

Die Kulturen wurden im Rahmen dieser Arbeit aus den Wurzeln steriler Keimlinge angelegt, die wie unter II.2.4. beschrieben angezogen wurden.

3.2. Medien

Für die Versuche zum Wachstum der Wurzelkulturen wurden folgende Medien verwendet. Sie enthielten keine Pflanzenwuchs-

stoffe, wenn keine gesonderten Angaben gemacht werden. Zur Verfestigung diente 0,8% Bacto-Agar.

RS	nach Robbins und Schmidt, hergestellt nach der Vorschrift von UFFELIE (1951)
LSY	nach HASHIMOTO und YAMADA (1983) mit 10^{-8} M 6-Benzyladenin
ML	nach METZ und LANG (1964)
MS	nach MURASHIGE und SKOOG (1962)
ST	nach STIENSTRA (1954)
WH	nach WHITE (1954)

3.3. Sterilisationstechniken

Es konnten die unter II.2.3. beschriebenen Arbeitsmethoden für pflanzliche Zellkulturen benutzt werden.

3.4. Anlage und Kultivierung von Wurzelkulturen

Die Wurzel eines Keimlings wurde abgetrennt und auf RS-Festmedium überführt. Für die Erhaltung der Festkulturen wurden drei gutwachsende Wurzelstücke auf frisches Medium übertragen. Die Kulturdauer betrug vier bis sechs Wochen. Festkulturen konnten auch erhalten werden, indem Wurzelstücke aus der Suspensionskultur (s.u.) auf das gleiche Medium in fester Form gelegt wurden.

Eine Suspensionskultur der Wurzeln entstand durch das Übertragen einer Festkultur in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml Medium. Nach vier Wochen konnten durch Verteilen der Wurzeln weitere Kulturen angelegt werden.

Die Anzucht von Wurzelsuspensionskulturen erfolgte in Erlenmeyerkolben der Größen 50, 100, 300 oder 1000 ml, die 25, 50, 150 bzw. 400 ml Medium enthielten. Das Inoculum betrug 0,5 - 1 g Frischgewicht pro 100 ml Medium.

Vor dem Animpfen von Versuchskulturen wurden die Wurzeln aus

drei Wochen alten Kulturen auf einem Büchnertrichter vom Medium getrennt. Das Frischgewicht des Inoculums konnte für jeden Kolben des Experiments durch Wägung bestimmt werden.

Für Selektionsuntersuchungen wurden 50 ml-Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium mit einzelnen Stücken aus einer Wurzelkultur angeimpft. Vor der Aufarbeitung wurden bei diesen Versuchen Subkulturen mit wenigen Wurzelstückchen angelegt.

Die Kulturbedingungen für Fest- und Suspensionskulturen glichen denen für pflanzliche Zellkulturen (vgl. II.2.4. und II.2.5.). Die Kulturdauer betrug drei Wochen.

3.5. Aufarbeitung von Wurzelkulturmaterial

Bei neu angelegten Kulturen mit unbekannten Eigenschaften wurde wie unter II.2.6. beschrieben verfahren.

Für die Arbeit mit der Kultur Hyoscyamus niger Hn 61 konnte eine Vereinfachung durch folgende Änderung erreicht werden. Die Wurzelmasse eines Kolbens wurde nach der Abtrennung des Mediums getrocknet und nach der Bestimmung des Trockengewichts zerkleinert. Ein Aliquot (ca. 30 mg TG) wurde mit 5,0 ml Methanol 70% zwölf Stunden lang bei 40°C extrahiert und für die Bestimmung des Alkaloidgehalts verwendet. Kontrollversuche ergaben, daß die Ergebnisse bei diesem Vorgehen denen nach Extraktion von frischem oder gefriergetrockneten Wurzelmaterial von Hyoscyamus niger Hn vergleichbar waren. Auch der Zusatz von Referenzsubstanzen zum frischen Pflanzenmaterial und die Bestimmung der wiedergefundenen Alkaloidmenge nach dem vereinfachten Verfahren der Aufarbeitung lieferte keine Hinweise auf einen Abbau der Alkaloide Hyoscyamin und Scopolamin. Vorteilhaft war der geringere Fehler bei der Bestimmung des Trockengewichts gegenüber dem durch Wägung und Trocknung eines Aliquots der Wurzelmasse aus einem Kolben gemessenen Wert.

Zur Berechnung des Alkaloidgehalts von Wurzelmaterial in Suspensionskultur wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Gehalt (\% TG)} = \frac{\text{Alkaloid in Wurzeln und im Medium (mg)}}{\text{Trockengewicht der Wurzeln (mg)}} \times 100$$

Die Aufarbeitung von Wurzelkulturen nach der Biotransformation radioaktiv markierter Substanzen geschah nach der folgenden Vorschrift. Wurzeln und Medium wurden getrennt, die Wurzeln kurz mit H_2O gespült, Waschwasser und Medium vereinigt und das Gesamtvolumen bestimmt. Die Wurzeln, entsprechend einem Trockengewicht von 100 - 200 mg, wurden zweimal mit 10 - 15 ml heißem Methanol für 20 min extrahiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Gesamtvolumens der vereinigten Extrakte. Nach Bestimmung der Radioaktivität in Aliquots von Medium und Extrakt unter Einsatz eines ^{14}C -Standards konnte die gesamte wiedergefundene Radioaktivität berechnet werden.

Zur Bestimmung des Anteils einzelner Alkaloide an der gesamten Radioaktivität wurden Aliquots von Medium und Extrakt, entsprechend 74 Bq (2 nCi), im Laufmittel 2 chromatografiert. Die Alkaloide wurden nach Alkalisieren der Proben mit 2 M Na_2CO_3 -Lösung durch dreimaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat von störenden Begleitstoffen befreit. Kontrollversuche zeigten, daß so 95% der Radioaktivität aus dem Extrakt und 85% aus dem Medium isoliert wurden. Fünfmaliges Ausschütteln hätte die Ausbeute um jeweils 4% der Gesamtaktivität erhöht. Nach der Aufnahme der relativen Verteilung der Radioaktivität auf den Chromatogrammen konnte der Anteil einzelner Alkaloide an der Gesamtaktivität berechnet werden.

Produkte mit einem Anteil an der gesamten Radioaktivität von weniger als 0,5% lagen bei diesem Vorgehen unter der Nachweisgrenze. Um sie zu detektieren, wurden die Alkaloide aus Aliquots von Medium und Extrakt, entsprechend 0,74 kBq (20 nCi), wie beschrieben isoliert und durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 2 und 4

aufgetrennt. Nach dreiwöchiger Exposition lieferten Röntgenfilme (XAR-5 X-RAY, 18x24 cm, Fa. Kodak) Autoradiographien dieser Chromatogramme, auf denen alle Produkte mit einem Anteil an der Gesamtaktivität von 0,02% und mehr zu erkennen waren. Die Beschreibung der Lage eines Substanzflecks auf dem zweidimensionalen Chromatogramm geschah durch das Wertepaar A/B aus den Rf-Werten im Laufmittel 2 (A) und 4 (B).

4. Reagenzien

4.1. Chemikalien

Die verwendeten Radiochemikalien ^3H -Methyliodid (TRK.706; spezifische Aktivität 3,15 TBq/mmol oder 85 Ci/mmol) und ^{14}C -Methyliodid (CFA.8; spezifische Aktivität 2,13 GBq/mmol oder 58 mCi/mmol) wurden von der Fa. Amersham (Braunschweig) geliefert.

$6\beta,7\beta$ - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyaminhydrochlorid (spezifische Aktivität 2,00 MBq/mmol = 4,2 μCi /mmol) wurde von Prof. Leete, Minneapolis, zur Verfügung gestellt. Ihm sei dafür an dieser Stelle herzlich gedankt.

Als Szintillator für Radioimmuntests wurde Minisolve 1 der Fa. Zinsser (Frankfurt/M.) verwendet, bei anderen Messungen Rotiszint 22 der Fa. Roth (Karlsruhe).

Die Alkaloide L-Hyoscyamin und L-Hyoscyaminhydrochlorid stammten von der Fa. Sigma (Deisenhofen), L-Scopolaminhydrobromid von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma. Dehydrohyoscyamin und sein Hydrochlorid wurden freundlicherweise von Prof. Gross, Ulm zur Verfügung gestellt, 6β -Hydroxyhyoscyamin von Prof. Peigen, Peking. Für die anderen Tropanalkaloide zur Bestimmung der Kreuzreaktionen sei Prof. Evans, Nottingham, Großbritannien, und Prof. Griffin, Brisbane, Australien, gedankt.

Alle übrigen Chemikalien und Lösungsmittel waren von größtmöglicher Reinheit. Sie wurden wie vom Laborfachhandel bezogen eingesetzt.

4.2. Lösungen

Als Sprühreagenz für die Dünnschichtchromatographie diente Dragendorff-Reagenz. Die Stocklösung entstand durch Vereinigen von 0,85 g bas. Wismut(III)nitrat, gelöst in 10 ml Essigsäure, 40 ml H_2O und 8 g KI, gelöst in 20 ml H_2O . Mischen von 1 ml Stocklösung, 2 ml Essigsäure und 10 ml H_2O ergab das fertige Sprühreagenz (AUTERHOFF und KOVAR, 1981).

Natriumkarbonatpuffer pH 9,6 (0,05 M) bestand aus 4,2 g NaHCO_3 in H_2O ad 1000 ml und wurde mit NaOH eingestellt.

Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung PBS (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) enthielt 1,824 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0,247 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 8,77 g NaCl und H_2O ad 1000 ml.

Blocklösung bestand aus PBS mit 0,5% Rinderserumalbumin.

Tris-Puffer pH 7,8 (0,1 M Tris, 1 mM MgCl_2) bestand aus 12,2 g Tris, 0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und H_2O ad 1000 ml und wurde mit HCl eingestellt. Durch Zusatz von 87,6 mg/ml NaCl und 0,1% Tween 80 entstand daraus der Testpuffer III.

Trisgepufferte physiologische Kochsalzlösung (0,05 M Tris, 1 mM MgCl_2 , 0,15 M NaCl) enthielt 6,1 g Tris, 0,2 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 8,77 g NaCl, H_2O ad 1000 ml und wurde mit HCl auf pH 7,8 eingestellt.

AP-Substratlösung wurde durch Lösen von 1 mg/ml 4-Nitrophenylphosphat in 1 M Diethanolaminpuffer pH 9,8 stets frisch bereitet. Der Puffer enthielt 105 g Diethanolamin, 105 mg $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und H_2O ad 1000 ml und wurde mit HCl titriert.

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde durch Rühren von 800 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 1 l H_2O über zwölf Stunden und Abfiltrieren des Bodensatzes hergestellt. Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 ein-

gestellt. Im Radioimmunoassay wurden die angegebenen Verdünnungen dieser Lösung eingesetzt.

Die Standardstocklösungen der Alkaloide wurden in einer Konzentration von 1,00 mg/ml mit Methanol p.a. hergestellt und bei -20°C gelagert. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Wasser.

5. Geräte

Neben den Einrichtungen, die in den Beschreibungen des Methodenteils genannt werden, kamen folgende Geräte zum Einsatz.

Gefriertrocknungsanlage	Modulyo, Fa. Edwards, Kniese & Co (Marburg)
Kernresonanzspektrometer	AM 360, Fa. Bruker (Karlsruhe) mit den Meßfrequenzen 360 MHz (^1H -Spektren) und 90,6 MHz (^{13}C -Spektren)
Linear-Scanner	zur Aufnahme der Radioaktivitätsverteilung auf Chromatogrammen. Typ LB 2832, Fa. Berthold (Wildbad)
Massenspektrometer	Finnegan Mat 44S mit Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) oder chemischer Ionisation (CI, 180 eV)
Mikroskope	Auflichtmikroskope Diavert (Fa. Leitz, Wetzlar) und Typ 471750 (Fa. Zeiss, Oberkochen)
pH-Meter	Digi 610, Fa. WTW (Weilheim) CG 819, Fa. Schott (Hofheim a. Ts.)
Photoausrüstung	Spiegelreflexkamera Contax RTS, Fa. Yashica (Japan) mit Objektiven der Fa. Zeiss

	Filmmaterial für s/w-Aufnahmen Ilford FP4 22 Din (Fa. Ilford, Mobberley, GB), sonst Agfachrome CT 100 21 Din (Fa. Agfa-Gevaert, Leverkusen)
Photometer	Spektralphotometer DMR 11 der Fa. Zeiss (Oberkochen) MR 600 der Fa. Dynatech (Denken- dorf) für Microtiterplatten, on-line-Verbindung zu einem Tisch- rechner Apple IIe (Fa. Apple, USA) zur Bearbeitung der Meßwerte mit dem ELISA-Auswerteprogramm der Fa. Nuclear Interface (Münster); Ausdruck mit Matrixdrucker RX 80 der Fa. Epson (Düsseldorf)
Pipettierhilfe	Multipette 4780, Fa. Eppendorf (Hamburg) Pipetboy, Fa. Tecnomara (Fernwald)
Polarimeter	Typ 241 der Fa. Perkin-Elmer (Über- lingen), Küvettenvolumen 1,2 ml
Radioimmuntestsystem	Ständer für je 100 Zentrifugen- gläser 13x60mm, Multivortexmischer und Cryofuge 6-6 (Heraeus) mit Analmatik-Rotorsystem, Fa. Zinsser (Frankfurt/M.)
Szintillationszähler	Betaszint BF 8000, Fa. Berthold (Wildbad)
Waagen	Laborwaage 1213 MP und Analysen- waage 2007 MP6E, Fa. Sartorius (Göttingen) Feinwaage M5 SA, Fa. Mettler (Zürich)
Wasseraufbereitung	MilliQ-Water-Purification-System, Fa. Millipore (Bedford, USA) Muldestor Destillationsanlage, Fa. Wagner & Munz (München)

Zentrifugen

Sorvall RC 58, Fa. DuPont Instruments (Bad Nauheim) mit den Rotoren SS 34 und GSA
 Minifuge II und Labofuge II, Fa. Heraeus (Osterode)
 Tischzentrifuge 5412, Fa. Eppendorf (Hamburg)

6. Gewinnung zellfreier Proteinextrakte

Der Aufschlußpuffer mit pH 7,5 enthielt 0,1 mol/l K-Phosphat, 0,25 mol/l Saccharose und 3 mmol/l Dithioerythritol (Fa. Sigma, Deisenhofen). Das Wurzelmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem schnellaufenden Messer zerkleinert. Das Pulver wurde mit Polyvinylpyrrolidon (unlösliches PVP, Fa. Sigma, Deisenhofen) im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und in 20 ml Aufschlußpuffer für 10 g Zellen zu einem homogenen Brei gerührt. Nach Klären durch Mull wurde der Preßsaft 20 min bei 13000 g zentrifugiert.

Der Proteingehalt wurde mit dem Verfahren nach LOWRY et al. (1951) in der Modifikation von BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) gemessen. Relative Proteinkonzentrationen in Säuleneluatens wurden durch Messung der Aromatenabsorption bei 280 nm und nach der Methode von BRADFORD (1976) analysiert.

Der Proteingehalt immunogener Konjugate wurde nach der Methode von EHRESMANN et al. (1973) bestimmt.

7. Chromatographische Verfahren

7.1. Dünnschichtchromatographie

Für analytische Fragestellungen wurden Kieselgeldünnschichtplatten verwendet (20 cm x 20 cm x 0,25 mm; Polygram Sil G/UV₂₅₄; Fa. Macherey und Nagel, Düren). Für präparative Auftrennungen wurden Dickschichtplatten unter Verwendung von

Kieselgel 60 GF₂₅₄--(Fa. Merck, Darmstadt) hergestellt. Die Tabelle 1 zeigt die eingesetzten Laufmittelsysteme.

Nr.	Laufmittelsystem	
1	Chloroform : Aceton : Diethylamin	= 5 : 4 : 1
2	Chloroform : Methanol : Ammoniak 25%	= 85 : 15 : 1,5
3	Aceton : Wasser : Ammoniak (25%)	= 90 : 7 : 3
4	Chloroform : Aceton : (Ethanol:Ammoniak 25% = 17:3)	= 5 : 4 : 1
5	Chloroform : Methanol	= 3 : 1
6	Toluol : Methanol	= 6 : 2
7	Toluol : Aceton : Methanol : Ammoniak 25%	= 40 : 45 : 10 : 5
8	Chloroform : Diethylamin	= 9 : 1
9	Ethylazetat : Ethanol : Diethylamin	= 60 : 30 : 10
10	Methanol	
11	Chloroform : Isopropanol : Ammoniak 25%	= 45 : 35 : 10
12	Chloroform : Methanol : Ammoniak 25%	= 85 : 15 : 4

Tab. 1: Laufmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie

7.2. Gaschromatographie (GLC)

Alkaloidextrakte wurden auf einer 12 m langen Kapillarsäule mit dem Innendurchmesser 0,23 mm, belegt mit PB 1, mit dem Gaschromatographen Typ 8500 der Fa. Perkin-Elmer (Überlingen) aufgetrennt. Als Trägergas diente Helium bei einem Druck von 0,89 bar. Die Detektion erfolgte durch einen stickstoffselektiven Detektor (PND) mit einem Wasserstoff-Luft-Gemisch als Detektionsgas. Bedingungen: Injektortemperatur 300°C, 150°C 2 min isotherm, dann 10°/min ansteigend bis 320°C, Splitver-

hältnis 1:30. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mit Referenzsubstanzen. Die Säule verfügt unter den Bedingungen über 40 000 theoretische Trennböden und erlaubt daher die vollständige Auftrennung von komplexen Gemischen (WINK et al. 1982).

Bei Herrn Dr. M. Wink möchte ich mich hier herzlich für die Durchführung der Messungen bedanken.

7.3. Säulenchromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

Die Gelfiltration ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins in einem Gemisch. Durch den Nachweis der Enzymaktivität erhält man Aufschluß über das Elutionsverhalten des gesuchten Proteins. Eine einheitliche Größe und Ladungsdichte vorausgesetzt, läßt sich durch Vergleich mit Standardproteinen das Molekulgewicht berechnen (ANDREWS, 1964; 1965).

Verwendet wurde eine Glassäule mit dem Innendurchmesser 25 mm, gefüllt mit Sephadex G 100 (Fa. Pharmacia, Uppsala). Das Gelbett war 109 cm lang und hatte ein Volumen von 535 ml. Das Ausschlußvolumen der Säule betrug 155 ml. Zur Eichung dienten Dextranblau, Aldolase, BSA, Ovalbumin, Trypsininhibitor und Cytochrom C. Der verwendete Puffer war 10 mM K-Phosphat-Puffer mit 20 mM Mercaptoethanol pH 7,5. Die Chromatographiestation bestand aus Microperpex Pump 2132, Multirac 2111, Uvicord S 2138 und Chopper Bar Recorder 2065 der Fa. LKB (Bromma, Schweden).

Frau Löffler sei hier für Vorarbeiten und die Hilfe bei diesem Versuch herzlich gedankt.

8. Synthese von 6ß-Hydroxyhyoscyamin

Die Vorschrift stammte von FODOR et al. (1962). 1,24 mmol (= 478 mg) Scopolaminhydrobromid wurden in 1,4 ml H₂O ge-

löst und mit 0,4 g neutral gewaschenem Raney-Nickel versetzt. Die Reaktion erfolgte unter Wasserstoffatmosphäre von Normaldruck bei Raumtemperatur und unter leichtem Rühren. Nach 61 Stunden wies die dünnschichtchromatographische Untersuchung (Laufmittel 2) den vollständigen Umsatz von Scopolamin nach. Entstanden waren zwei Produkte etwa im Verhältnis 1:1, deren R_f-Werte denen von Hyoscyamin und 6 β -Hydroxyhyoscyamin glichen.

Die Reinigung des 6 β -Hydroxyhyoscyamins geschah durch Chromatographie auf Dickschichtplatten. Im ersten Schritt wurde Laufmittel 8 verwendet. Die der Referenzsubstanz entsprechende Zone wurde eluiert. Im zweiten Schritt wurde zuerst Laufmittel 10 benutzt, die Platte dann kurz abgetrocknet und in Laufmittel 2 erneut entwickelt. Das Eluat ergab 0,43 mmol (= 130 mg) 6 β -Hydroxyhyoscyamin in Form eines weißlichen Schaums.

EI-MS: 305 (M⁺), 287, 261, 243, 167, 156, 149, 140, 122, 121, 112, 110, 103, 95, 94, 57, 55. Dieses Massenspektrum zeigte gute Übereinstimmung mit den Literaturangaben (CONG, 1981) und belegte die Struktur des Syntheseprodukts (s.a. III.13.4).

9. Produktion von polyklonalen Antikörpern

9.1. Immunisierung und Gewinnung der Antiseren

Die benötigten Kaninchen waren in einem klimatisierten Raum bei 20 - 22 °C untergebracht. Ihr Alter zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung war 12 - 15 Wochen.

Eine Lösung der immunogenen Konjugate, 2 mg/ml in PBS, wurde mit dem gleichen Volumen an komplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Difco, Detroit, USA) durch Ultraschall emulgiert (Soni-fier B15, Fa. Branson, Heusenstamm).

Der Immunisierungsvorgang begann mit vier Vorimmunisierungen im Abstand von jeweils einer Woche. Dabei wurde den Tie-

ren je 0,5 ml Emulsion subcutan am Rücken injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Vorimmunisierung erhielten die Tiere eine Boosterinjektion, die sich dann alle vier Wochen wiederholte. Hierzu wurde 1,0 ml Emulsion intramuskulär in die Oberschenkel gespritzt.

7 und 14 Tage nach jeder Boosterinjektion erfolgte eine Blutabnahme. Nach Ritzen der Ohrvene wurden 40 ml Blut aufgefangen und zur Gerinnung 2 Stunden bei Raumtemperatur und 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Der Blutkuchen wurde in einer Sorvall-Zentrifuge 10 min bei 10 000 g sedimentiert. Der Überstand bildete das Antiserum. Es wurde portioniert und bei -20°C gelagert.

Frau Schecklies danke ich herzlich für die Durchführung der Immunisierungen und Blutabnahmen.

9.2. Isolierung der Antikörper

Vor dem Einsatz in einem Enzymimmuntest müssen die Antikörper in möglichst gereinigter Form vorliegen. Beim Vorgehen nach II.12.2. ist dies besonders wichtig, um die beschränkte Bindungskapazität der Polystyroloberfläche in den Vertiefungen der Testplatten auszunutzen. Eine ausreichende Reinigung ergab das Verfahren nach HURN und CHANTLER (1980).

Der pH-Wert des Serums wurde mit 0,1 N NaOH auf 8,5 eingestellt. Pro 10 ml Serum wurden 35 ml Rivanollösung 0,4% zugetropft. Der Niederschlag wurde 10 min bei 4000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde 10 min mit Holzkohle (1,5 g/100 ml) gerührt, die Holzkohle dann durch Filtration und Zentrifugation (s.o.) entfernt. Der fast farblose Überstand wurde langsam mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung (vgl. II.4.2.) versetzt. Nach 12 Stunden bei 4°C wurde abzentrifugiert (s.o.), der Niederschlag in 3 ml Tris-Puffer pH 7,8 aufgenommen und drei Tage gegen H₂O dialysiert. Die Antikörperfraktion wurde dann lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

10. Erzeugung von monoklonalen Antikörpern

10.1. Immunisierung und Kontrolle der Antikörpertiter im Serum

Die Mäuse des Stammes Balb/c wurden in einem klimatisierten Raum bei 20 - 22 °C gehalten. Immunisiert wurden 6 - 7 Wochen alte weibliche Tiere, die aus eigener Nachzucht stammten.

Herrn Kutscher, Herrn Kassel und Herrn Reiter sei an dieser Stelle für die Pflege der Tiere gedankt.

Die immunogenen Konjugate wurden in Form einer frisch bereiteten Emulsion injiziert. Dafür wurde eine Lösung des Konjugats in steriler PBS (vgl. II.4.2.) im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Difco, Detroit, USA) gemischt und durch Ultraschall (Sonifier B15, Fa. Branson, Heusenstamm) emulgiert. Intramuskuläre Injektionen in den Oberschenkel und subcutane Injektionen wurden mit 0,05 ml Emulsion durchgeführt, bei intraperitonealer Injektion lag das Volumen bei 0,35 ml. Die eingesetzte Konjugatmenge lag zwischen 0,10 und 0,18 mg Protein pro Injektion. Kleinere Mengen erbrachten keine ausreichende Immunantwort. Die Tiere wurden nach verschiedenen Zeitplänen immunisiert. Am Ende des Immunisierungsprogramms erhielten die Mäuse Boosterinjektionen; dabei wurde Adjuvans durch das gleiche Volumen an steriler PBS ersetzt.

Eine Blutabnahme erfolgte eine Woche nach der letzten Immunisierung. Die Maus wurde im Zwangskäfig fixiert, die Schwanzvene geritzt und 0,020 ml Blut aufgefangen. Die Mikropipette wurde in 0,18 ml PBS hinein entleert. Nach 12 Stunden bei 4°C wurde in der Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand auf die Fähigkeit untersucht, radioaktiv markiertes Antigen zu binden.

0,050 ml Überstand wurden mit 0,400 ml eines Testgemisches versetzt, das 0,1 ml einer 1:6 verdünnten Rinderserumlö-

sung, 5000 cpm ^3H -Atropin und PBS ad 0,400 ml enthielt. ^3H -Atropin wurde durch Razemisierung von ^3H -Hyoscyamin (s. III.1.1.) gewonnen (GADAMER, 1901). ^3H -Hyoscyamin wurde in methanolischer Lösung 3 Tage lang einer Temperatur von 50°C ausgesetzt. Zersetzungsprodukte ließen sich danach durch die Dünnschichtchromatographie nicht nachweisen. Die Bindung an die Antikörper des Serums 160A verringerte sich. Da diese spezifisch mit L-Hyoscyamin reagierten, mußte ^3H -Hyoscyamin zumindest teilweise razemisiert worden sein. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung markierten Antigens an das Protein wurde in entsprechenden Proben der Überstand durch PBS ersetzt. Nach 60 min bei Raumtemperatur erfolgte die Trennung von gebundenem und freiem Antigen durch Zugabe von 0,5 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Nach weiteren 60 min wurde abzentrifugiert, das Pellet in 0,5 ml Ammoniumsulfatlösung 60% aufgeschüttelt und zentrifugiert. Nach Lösen des Pellets in 0,35 ml H_2O und Mischen mit 1,0 ml Szintillator wurde die in der Probe vorhandene Radioaktivität bestimmt (vgl. WEILER und ZENK, 1976). Zur Auswertung wurde die Bindung B_0 , d.h. der prozentuale Anteil der gemessenen Radioaktivität B an der eingesetzten Radioaktivität T nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{B - UB}{T} \times 100 = B_0$$

10.2. Tierische Zellkulturen und Medien

Für die Fusionen wurden die Myelomstämme P3-NS1-Ag4-1 (NS-1, KÖHLER et al., 1979), P3X63-Ag8.653 (X63), Sp2/0-Ag14 (Sp2/0), PAI (Abkömmling von P3X63-Ag8.653) und PAI/0 (Subklon von PAI) verwendet. Sie wurden von Prof. Köhler, Basel, zur Verfügung gestellt bis auf NS-1, der von Dr. Fantl, London, stammte.

Ein Standardmedium für tierische Zellkulturen ist RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute/ MOORE et al., 1967). Ausgehend vom Fertigmedium der Fa. Gibco (Wiesbaden) wurden Medien für verschiedene Zwecke bereitet.

RPMI+10	Stammhaltung der Myelomzellen	
	Rezeptur	
	10,0 ml	Fötales Kälberserum (FCS, Fa. Gibco)
	1,0 ml	Glutaminlösung 0,2 M
	1,0 ml	Natriumpyruvatlösung 100x (Fa. Gibco)
	1,0 ml	MEM Non Essential Amino Acids 100x (Fa. Gibco)
	0,05 ml	2-Mercaptoethanollösung 0,1 M
	1,0 ml	Penicillin-Streptomycin-Konzentrat 100x (Fa. Gibco)
	87,0 ml	RPMI 1640
AZA+10	Selektionsmedium für HGPRT-negative Zellen	
	Rezeptur wie RPMI+10, zusätzlich 2,0 ml Azaguaninlösung 50x (Fa. Sigma, Deisenhofen)	
HAT+15	Selektionsmedium nach der Fusion	
	Rezeptur wie RPMI+10, zusätzlich 2,0 ml HAT-Konzentrat 50x (Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin; Fa. Gibco) und Erhöhung des Anteils an FCS auf 15%	
HT+10	Aufbaumedium für Hybridomzellen	
	Rezeptur wie RPMI+10, zusätzlich 2,0 ml HT-Konzentrat 50x (Hypoxanthin/Thymidin; Fa. Gibco)	
DMSO+20	Einfriermedium	
	Rezeptur wie RPMI+10, aber Erhöhung des Anteils an FCS auf 20%, Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (Fa. Merck, Darmstadt) und entsprechende Verringerung der Menge an RPMI	

Die Medienbestandteile wurden in der Sterilbank vereinigt, das Medium dann durch ein Membranfilter (Porengröße 150 nm, Fa. Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert.

10.3. Kultivierung von Myelom- und Hybridomzellkulturen

Die Kulturen befanden sich in Begasungsbrutschränken (Fa. Heraeus, Osterode). Der CO_2 -Anteil der Atmosphäre war auf 5% eingestellt, die Temperatur betrug 37°C , die relative Feuchtigkeit 96%. Als Kulturgefäße dienten strahlensterilisierte Kunststoffflaschen mit 50 ml Rauminhalt (Fa. Nunc, Wiesbaden), die mit 10 ml Medium gefüllt waren. Zur Erhaltung einer Kultur wurde alle 2 bis 5 Tage 1 ml der Zellsuspension in 10 ml frisches Medium gegeben. Leichte Gelbfärbung der Kulturen galt als Anlaß für die Zugabe frischen Mediums.

Der Myelomstamm für eine Fusion wurde 14 Tage zuvor aufgetaut und 4 Tage bei täglichem Medienwechsel in AZA+10-Medium gehalten. Dann wurden die Zellen in RPMI+10-Medium passagiert. In den letzten Tagen vor der Fusion erfolgte die exponentielle Vermehrung. Dazu wurde der Inhalt einer Kulturflasche mit ca. 5×10^6 Zellen auf zwei Flaschen mit je 5 ml frischem RPMI+10-Medium verteilt und dies täglich wiederholt.

Unmittelbar nach der Fusion und zum Zweck der Klonierung wuchsen die Zellen in Gewebekulturplatten (Fa. Nunc) mit 24 und 96 Näpfen. Durch Absaugen der Hälfte des alten und Zupipettieren frischen Mediums war es möglich, diese Kulturen begrenzte Zeit zu erhalten.

Zur sicheren und langfristigen Erhaltung wurden die Zellstämme eingefroren. Der Inhalt einer Kulturflasche mit ca. 5×10^6 Zellen wurde abzentrifugiert (10 min, 200 g), in 1 ml DMSO+20-Medium von 4°C resuspendiert und in einem Kryoröhrchen (Fa. Nunc) durch langsames Abkühlen auf -80°C eingefroren. Die Lagerung erfolgte in Stickstofftanks bei -196°C .

Zum Auftauen wurde der Inhalt des Kryoröhrchens durch

Schwenken in 50°C warmem Wasser von den Wänden gelöst und in 40 ml RPMI 1640 von 37°C gegeben. Die Zellen wurden sedimentiert (200 g, 6 min) und mit 10 ml AZA+10-Medium für Myelomzellen bzw. RPMI+10-Medium für Hybridomzellen in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches ersetzt, um toxische Rückstände des Einfriermediums vollständig zu entfernen.

10.4. Durchführung der Fusion

Am Tag vor der Fusion wurden die benötigten Kulturplatten vorbereitet. Die Milz einer nicht immunisierten, 3-5 Monate alten Maus wurde steril entnommen und durch Aufziehen mit Kanülen Nr. 1 und 14 (Fa. Terumo, Leuven, Belgien) in 10 ml RPMI 1640 suspendiert. Während der nächsten 5 min setzten sich die größeren verbliebenen Gewebestücke ab. 9 ml des Überstandes wurden mit 40 ml RPMI aufgefüllt und die Zellen sedimentiert (200 g, 10 min). Nach Resuspendieren in 10 ml HAT+15-Medium erfolgte die Bestimmung der Zahl der gewonnenen Fütterzellen (nach FRESHNEY, 1983). Ein 0,100 ml-Aliquot wurde in 0,900 ml Türkscher Lösung (Essigsäure 3% in H₂O, 0,05% Gentiaviolett) verdünnt und in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal ausgezählt. Mit einer Suspension von 2×10^5 Zellen pro ml HAT+15-Medium wurden die Näpfe der Kulturplatten dann zur Hälfte gefüllt.

Die Aufarbeitung der Milz der immunisierten Maus erfolgte wie für die Fütterzellen beschrieben. Die Zellen wurden aber in 10 ml RPMI von 30°C suspendiert.

Zur Aufbereitung der Myelomzellen wurde die Zellsuspension aus 8 Kulturflaschen abzentrifugiert (200 g, 10 min). Die Zellen wurden in 45 ml RPMI von 30°C resuspendiert, erneut zentrifugiert (s.o.) und in 10 ml RPMI von 30°C aufgenommen. Die Zahl der lebenden Zellen wurde hier nach Verdünnen mit der Trypanblau-Lösung 2% in PBS ohne Calcium- und Magnesium-Ionen bestimmt.

Für die Fusion wurde das Protokoll von GALFRE und MILSTEIN (1981) mit kleineren Abwandlungen übernommen. Nach Vereinigen der Zellsuspensionen betrug das Verhältnis von Milz- zu Myelomzellen 5:1. Die Zellen wurden sedimentiert (200 g, 10 min) und so vollständig wie möglich trockengesaugt. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten in einem Wasserbad bei 37°C. Die Zellfusion wurde durch eine Lösung von 50% PEG 1500 in 75mM HEPES-Puffer (Fa. Boehringer, Mannheim; HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-2-piperazin-ethansulfonsäure) eingeleitet, die genau nach folgendem Schema angewandt wurde:

- Dosierung: 0,1 ml PEG-Lösung für 10^7 Milzzellen
- Zutropfen zum gelockerten Zellsediment unter leichtem Schütteln innerhalb von 60 Sekunden
- Einwirkdauer von 60 Sekunden
- Verdünnen mit RPMI von 37°C unter leichtem Schütteln in folgenden Schritten: 1 ml in 60 Sekunden, 1 ml in 60 Sekunden, 1 ml in 30 Sekunden, 7 ml in 2 min, 12 ml in 2 min
- Abzentrifugieren der Zellen (200 g, 5 min) nach einer Wartezeit von 5 min
- Trockensaugen des Zellsediment nach weiteren 5 min
- Suspendieren 100 ml HAT+15-Medium und Verteilen auf die vorbereiteten Kulturplatten

Nach 5 Tagen erhielten die Fusionsprodukte einen Medienwechsel mit HAT+15-Medium. Der nächste Austausch der Kulturflüssigkeit und alle weiteren erfolgten mit HT+10-Medium. Vom 14. bis 35. Tag nach der Fusion wurde das Wachstum der Zellkolonien mikroskopisch beobachtet.

10.5. Selektion der Hybridomzellen

Nach der Fusion liegt eine große Zahl an Zellen vor, die verschiedenen Ursprungs sind.

Unfusionierte Milzzellen und unkorrekte Fusionsprodukte, z.B. Hybride von zwei Milzzellen oder von mehr als zwei Zellen, vermehren sich nicht und sterben innerhalb einiger

Tage ab (GODING 1980).

Den eingesetzten Myelomstämmen fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT⁻-Zellen). Durch den Zusatz von Aminopterin im HAT+15-Medium sind die Zellen gezwungen, für die Synthese der Nukleotide Adenosintriphosphat und Guanosintriphosphat zugesetztes Hypoxanthin zu Inosin-5-Phosphat umzusetzen. Das Fehlen des entsprechenden Enzyms führt zum Absterben von HGPRT⁻-Zellen in diesem Medium (LITTLEFIELD, 1964).

Hybridomzellen besitzen als Nachkommen der HGPRT⁺-Zellen der Milz die notwendigen Enzyme und vermehren sich unter HAT-Selektion (KÖHLER und MILSTEIN, 1975).

Die Identifizierung von Zellkolonien mit der gewünschten Antikörperproduktion wird in III.5.4. beschrieben. Danach wurden die Zellen mit HT+10-Medium in Kulturplatten mit 24 Näpfen, später in Kulturflaschen vermehrt. Einfrieren der Zellen (vgl. II.10.3.) schützte vor Verlust der Zelllinie. Ein weiterer Teil der Zellen diente dem Aufbau eines monoklonalen Zellstamms.

Nach der Fusion reduziert sich allmählich die die Anzahl der Chromosomen in den Hybridomzellen (KÖHLER, 1980). Aus der genetisch uneinheitlichen Zellansammlung wurden monoklonale Zellstämme durch Klonierung, d.h. Anzucht einer Kolonie aus einer einzigen Zelle, erhalten. Gemäß dem Verfahren nach LEFKOVITS und WALDMANN (1979) wurde die Suspension der Zellen mit HT+10- Medium auf 10 Zellen pro ml eingestellt und 0,1 ml pro Napf auf Kulturplatten zu 96 Näpfen verteilt. Nach 7 bis 14 Tagen wurden die Näpfe mit genau einer Zellkolonie mikroskopisch ausgesucht und mit 0,1 ml Medium versorgt. Sieben Tage später erfolgte der Test auf spezifische Antikörper. Die ausgewählten Zellen wurden vermehrt, durch Einfrieren gesichert und wiederholt kloniert.

10.6. Gewinnung von Antikörpern

10.6.1. Antikörperproduktion durch in vitro-Kulturen

In Zellkulturüberständen lassen sich Antikörperkonzentrationen von 0,001 - 0,02 mg/ml erreichen (GODING, 1983). Bis auf geringe Verunreinigungen aus dem verwendeten Kälberserum werden so reine monoklonale Antikörper erhalten.

Zur Produktion wurden nach der Erschöpfung des Kulturmediums, zu erkennen an der stark gelben Färbung, die Zellen abzentrifugiert (200 g, 10 min) und der Überstand bei -20°C gelagert.

10.6.2. Antikörperproduktion in vivo

Nach Einspritzen von Hybridomzellen in die Bauchhöhle von Balb/c-Mäusen wird Ascitesflüssigkeit gebildet, die Antikörper in Konzentrationen von 5 - 15 mg/ml (GODING, 1983) enthält. Ein Nachteil ist die Verunreinigung der monoklonalen Antikörper mit anderen Proteinen, insbesondere mit Antikörpern anderer Spezifität.

Die 3 bis 5 Monate alten, männlichen Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Pristane (Fa. Sigma, Deisenhofen) vorbereitet (HOOGENRAAD et al., 1983). Sechs Wochen später erfolgte die Injektion von 1 - 2×10^6 Zellen in 0,5 ml sterilem PBS. Nach 10 bis 20 Tagen wurde die entstehende Flüssigkeit mit einer Kanüle aus der Bauchhöhle abgezogen, zentrifugiert (1900 g, 10 min) und der Überstand bei -20°C gelagert.

10.7. Bestimmung der Immunglobulinklassen

Monoklonale Antikörper gehören stets einer ganz bestimmten Antikörper(sub)klasse an. Ihre Kenntnis ist für die Auswahl bekannter Reinigungsmethoden für Immunglobuline entsprechend

der Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers von Bedeutung (SCHULTZE und HEREMANS, 1966; PARHAM, 1983).

Die Charakterisierung geschah durch einen ELISA nach dem Sandwich-Prinzip (MAGGIO, 1980) unter Verwendung von subklassenspezifischen Rabbit-Anti-Mouse-Antiseren (RAM) gegen IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, Fab und Ig aller Klassen (Fa. Nordic, über Fa. Biogenzia Lemanía, Bochum) zur Beschichtung der Mikrotiterplatten. Die Detektion erfolgte durch Rabbit-Anti-Mouse-Antikörper gegen alle Immunglobulin-klassen, gekoppelt an alkalische Phosphatase (= RAM-AP-Konjugat; Fa. Nordic).

Die Durchführung zeigt die folgende Vorschrift. Bei jedem Wechsel der Lösungen wurde die Platte durch dreimaliges Füllen mit PBS gewaschen.

- Beschichten der Näpfe einer ELISA-Platte (Typ I 96F, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 0,2 ml der 1:100-Verdünnung der RAM-Lösungen in Natriumkarbonatpuffer pH 9,6 bei Raumtemperatur über 16 Stunden
- Absättigen der Bindungskapazität mit 0,25 ml Blocklösung bei Raumtemperatur über 6 Stunden
- Inkubation mit 0,15 ml Zellkulturüberstand der zu charakterisierenden Zelllinie unter Zusatz von 0,05 ml Tris-Puffer mit 1,5 M NaCl und 0,1% Tween 80 zur Verringerung unspezifischer Bindungen bei 4°C über 18 Stunden
- Inkubation mit 0,2 ml Lösung von RAM-AP-Konjugat in der Verdünnung 1:500 mit Tris-Puffer bei 4°C über 7 Stunden
- Waschen der Näpfe mit H₂O und Inkubation mit 0,2 ml AP-Substratlösung bei 37°C
- Messung der Extinktion bei 410 nm

11. Durchführung der Radioimmuntests für Tropanalkaloide

Die Durchführung entsprach dem von WEILER und ZENK (1976) beschriebenen Verfahren. Für den Scopolamin-RIA konnte die von WEILER et al. (1981b) angegebene Vorschrift verwendet werden.

Vier verschiedene Typen von Ansätzen wurden pipettiert, deren Zusammensetzung die Tabelle 2 zeigt. Das Testgemisch bestand aus 0,10 ml der Rinderserumlösung 1:6, 5000 cpm des markierten Alkaloids und PBS ad 0,75 ml.

Ansatztyp	H ₂ O (ml)	Standard/ Probe (ml)	Test- gemisch (ml)	Antikörper- verdünnung (ml)
100% (Eingesetzte Radioaktivität)	--	--	0,10	--
UB (Unspezifische Bindung)	0,15	--	0,75	--
Bo (Bindung ohne unmarkiertes Alkaloid)	0,05	--	0,75	0,10
B (Standards und Proben)	--	0,05	0,75	0,10

Tab. 2: Ansätze für den Radioimmuntest

Die Ansätze wurden 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von Ammoniumsulfatlösung und erneuter, ein-stündiger Inkubation konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zentrifugation sedimentiert werden. Nach Verwerfen der

Überstände wurden die Pellets in Ammoniumsulfatlösung aufgeschüttelt und erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 0,35 ml Wasser gelöst und mit 1,0 ml Szintillator gemischt. Die Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationszähler bestimmt.

12. Durchführung der Enzymimmuntests für Tropanalkaloide

12.1. Beschichten von Mikrotiterplatten mit Protein A

Die Näpfe der Mikrotiterplatte (Immulon 96KF, Fa. Dynatech, Denkendorf) wurden mit je 0,10 ml einer Suspension von 10 mg IgSorb (Fa. Enzyme Center, Malden, USA) in 10 ml NaCl-Lösung 0,9% gefüllt. Nach Zentrifugation (100 g, 10 min) wurden sie für 10 min in eine Glutaraldehydlösung 0,5% getaucht und anschließend durch dreimaliges Füllen mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit 0,25 ml Blocklösung bei Raumtemperatur über eine Stunde waren die Platten vorbereitet.

12.2. Ablaufschema des Enzymimmuntests

Grundsätzlich folgte die Durchführung dem von WEILER et al. (1981a) angegebenen Verfahren. Für den Scopolamin-Enzymimmuntest konnte auf Vorarbeiten von Frau Brockhaus am Institut für Pharmazeutische Biologie zurückgegriffen werden. Verwendet wurden unbehandelte Immulon-Mikrotiterplatten der Fa. Dynatech, die eine rasche Auswertung mit dem Photometer MR 600 (vgl. II.5.) ermöglichten.

Zwischen den Schritten des folgenden Testablaufs wurden die Platten durch dreimaliges Füllen mit PBS gewaschen. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch auf die Temperatur gebracht, die bei der folgenden Inkubation herrschte.

- Beschichten der Näpfe durch Inkubation mit 0,20 ml Natriumkarbonatpuffer pH 9,6 mit 0,005 mg/ml Antikörper

(s.II.9.2.) bei Raumtemperatur über 16 Stunden. Näpfe zur Bestimmung der unspezifischen Bindung UB bleiben frei.

- Inkubation mit 0,25 ml Blocklösung bei 4°C über 30 min
- Benetzen der Näpfe mit 0,05 ml Testpuffer I und Zupipettieren von 0,10 ml H₂O in die UB-Werte und in die Näpfe zur Bestimmung der maximalen Bindung B₀ bzw. von 0,10 ml Standard-/Probenlösung zur Bestimmung der jeweiligen Bindung B. Zupipettieren von 0,05 ml der Lösung des Enzymtracers in Testpuffer II, eingestellt auf eine Extinktion für B₀ von 0,8 - 1,0. Inkubation bei 4°C über 4 Stunden.
- Inkubation mit AP-Substratlösung bei 37°C über 2 Stunden und Messung der Extinktion bei 410 nm.

Die gesamte eingesetzte Enzymaktivität T ergab sich durch Bestimmung der Phosphataseaktivität in der Enzymtracerlösung nach MÖSSNER et al. (1980).

13. Berechnung der Ergebnisse immunologischer Bestimmungsverfahren

Die cpm-Werte aus der Radioaktivitätsmessung im Radioimmuntest und die Werte für die Extinktion im Enzymimmuntest konnten gleich behandelt werden. Folgende Berechnungen wurden durchgeführt:

Berechnung der gesamten eingesetzten Radioaktivität

$$T = 100\% \times 7,5$$

Berechnung der unspezifischen Bindung in Prozent UB(%)

$$UB(\%) = \frac{UB \times 100}{T}$$

Berechnung der Bindung in Prozent der eingesetzten Gesamtaktivität B₀(%), B(%)

$$B_0(\%), B(\%) = \frac{(B - UB) \times 100}{T}$$

Berechnung der relativen Bindung in Prozent der maximalen Bindung des markierten Alkaloids $B/B_0(\%)$

$$B/B_0(\%) = \frac{(B-UB) \times 100}{B_0 - UB}$$

Die Standardkurven wurden aus den B/B_0 -Werten berechnet.

Linearisierung der Standardkurve durch die logit-Transformation (FELDMANN und RODBARD, 1971)

$$\text{logit } B/B_0 = \ln \frac{B/B_0(\%)}{100 - B/B_0(\%)}$$

III. E R G E B N I S S E

1. Radioimmuntest für Hyoscyamin

1.1. Synthese von ^3H -Hyoscyamin und ^{14}C -Hyoscyamin

Neben dem Antikörper bestimmen die Eigenschaften des radioaktiv markierten Antigens wesentlich die Merkmale eines Radioimmuntests. Wünschenswert im Sinne einer hohen Empfindlichkeit des Testsystems ist eine hohe spezifische Aktivität, damit schon die Verdrängung einer kleinen Zahl markierter Moleküle durch geringe Mengen der zu bestimmenden Substanz nachgewiesen werden kann.

Zur Markierung von Antigenen für Radioimmuntests haben sich in der Vergangenheit die Isotope ^3H und ^{125}J bewährt. Sie erlauben ausreichende spezifische Aktivitäten und besitzen doch keine zu kurzen Halbwertszeiten.

Für die Bestimmung von Hyoscyamin wurde eine Markierung mit Tritium gewählt. Zwei Gründe waren dabei ausschlaggebend: Das tritiummarkierte Hyoscyamin entspricht in seiner Struktur völlig der zu messenden Verbindung. Nahezu identische immunologische Eigenschaften der beiden Moleküle sind daher gesichert. Die Kopplung eines Jodatoms von der ungefähren räumlichen Größe eines Benzolmoleküls an ein niedermolekulares Antigen führt dagegen zu großen strukturellen Unterschieden zum unmarkierten Antigen. Gleiches Verhalten gegenüber den Antikörpern kann nicht ohne weiteres erwartet werden. Außerdem bedingt die kurze Halbwertszeit des ^{125}J von 60 Tagen - gegenüber 12 Jahren bei Tritium - häufigere Neusynthesen der markierten Verbindung. Der Nachteil des Tritiums ist seine maximale spezifische Aktivität von 1,05 TBq/mmol gegenüber 74 TBq/mmol bei ^{125}J . Nach Dreifachmarkierung des Hyoscyamins war die erreichte spezifische Aktivität jedoch ausreichend.

Die Synthese tritiummarkierten Hyoscyamins erfolgte durch

Methylierung von Norhyoscyamin mit ^3H -Methyljodid nach CARR und REYNOLDS (1912). Vorversuche zeigten, daß diese Reaktion bei Einsatz eines Überschusses der Norverbindung entgegen den Angaben von FODOR et al. (1960) gute Ausbeuten an Hyoscyamin lieferte. Das benötigte Norhyoscyamin war durch Demethylierung von Hyoscyamin nach der Vorschrift von PFISTER (1978) zugänglich. Die zur Darstellung von Norscopolamin geeignete Methode der oxidativen Demethylierung mittels Kaliumpermanganat (BANHOLZER et al., 1969) lieferte dagegen keine brauchbaren Ausbeuten an Norhyoscyamin.

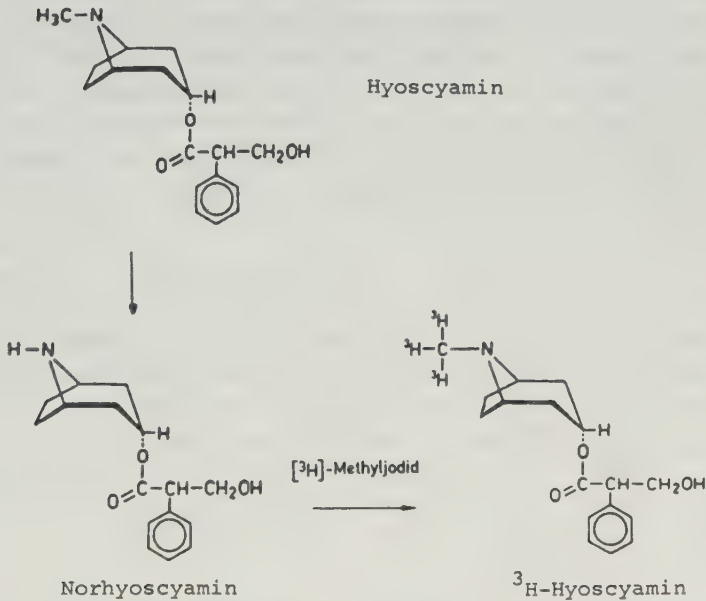


Abb. 4: Synthese von ^3H -Hyoscyamin

Arbeitsvorschrift der Demethylierung von Hyoscyamin:

Eine Mischung von 17,3 mmol (= 5,00 g) Hyoscyamin, 87 mmol (= 12 ml) Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester (Fa. EGA-Chemie, Steinheim), 173 mmol (= 17,28 g) KHCO_3 und 250 ml Chloroform wurde 4 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Die abgekühlte Mischung wurde filtriert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand im Kugelrohr bei 80°C an der Ölpumpe von überschüssigem Chlorameisensäure-2,2,2-trichlorethylester befreit. Der Rückstand wurde in 100 ml Essigsäure mit 10 g aktiviertem Zinkstaub (TSUDA et al., 1963) 16 Stunden bei 15°C gerührt. Nach Filtrieren und Waschen des Rückstands mit 50 ml Essigsäure wurde das Filtrat mit 150 ml H_2O verdünnt und unter Kühlen auf Temperaturen unter 10°C mit NH_3 auf pH 6 eingestellt. Neutrale Substanzen wurden mit 100 ml Ether ausgeschüttelt und die NH_3 -Zugabe fortgesetzt bis pH 10, wo die Produkte mit 4 x 150 ml Chloroform ausgeschüttelt wurden. Die Produktlösung wurde mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über wasserfreiem K_2CO_3 getrocknet und zur Trockne eingengt.

Der Rückstand bestand aus 3,47 g Norhyoscyamin, das sind 73% der theoretischen Ausbeute. Sein Schmelzpunkt betrug 130°C (Literatur 133 – 134°C , BERTHOLD et al., 1967). Seine Struktur konnte durch Massenspektrum und Kernresonanzspektrum bewiesen werden. Massenspektrum (EI): 275 (M^+), 257, 149, 126, 121, 81, 68. ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3): 1,21 – 2,10 (m, 8 H, C2-H, C4-H, C6-H, C7-H); 3,33 und 3,45 (2t, 2 H, $\text{J} = 3$ Hz, C1-H und C5-H); 3,76 – 3,90 (m, 2 H, CH_2OH); 4,12 – 4,28 (m, 1 H, Ph-CH); 5,10 (t, $\text{J} = 5$ Hz, C3-H); 7,23 – 7,43 (m, 5 H, Aromat).

Die polarimetrische Untersuchung der Enantiomerenreinheit ergab einen Gehalt von 90% L-Norhyoscyamin und 10% der D-Form.

Arbeitsvorschrift der Methylierung von Hyoscyamin:

Eine Ampulle enthielt 118 nmol (370 Mbq, spez. Aktivität

3,15 TBq/mmol) ^3H -Methyljodid in 1 ml Toluol. Ihr wurden 472 nmol (= 0,13 mg) Norhyoscyamin zugesetzt, gelöst in 0,05 ml Toluol. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur unter Lichtschutz über 165 Stunden. Die anschließende Dünnschichtchromatographie im Laufmittel 1 ergab folgende Radioaktivitätsverteilung: Start 4,1%, R_f 0,18 (Norhyoscyamin) 1,1%, R_f 0,36 (Hyoscyamin) 84%, R_f 0,47-0,85 9,5%, Front 1,3%.

Das methanolische Eluat der Zone des Hyoscyamins ergab eine Ausbeute von 56 MBq, das sind 15% der eingesetzten Radioaktivität.

Das ^3H -Hyoscyamin wies nach Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 2,3 und 4 bei einer Nachweisgrenze von 0,1% keine Verunreinigungen auf und glich in seinem Laufverhalten stets dem Hyoscyamin. Da bei der Synthese nur durch Methylierung Hyoscyamin entstand und jeweils eine tritiierte Methylgruppe auf ein Molekül Norhyoscyamin übertragen wurde, betrug die spezifische Aktivität des ^3H -Hyoscyamins 3,15 TBq/mmol (= 85 Ci/mmol).

Die gleiche Reaktionsfolge ermöglichte auch die Synthese von ^{14}C -Hyoscyamin. Da ^{14}C -Methyljodid nicht als Lösung, sondern gasförmig geliefert wird, war eine etwas abweichende Arbeitsvorschrift anzuwenden. Im Reaktionsgefäß wurden 69,4 mol (= 19,5 mg) Norhyoscyamin in 0,60 ml trockenem Methanol gelöst. Die verschlossene Ampulle mit 17,4 μmol (37 MBq = 1 mCi; spez. Aktivität 2,13 GBq/mmol = 58 mCi/mmol) ^{14}C -Methyljodid und das Reaktionsgefäß wurden durch ein Glasrohr mit Vakuumhahn verbunden. Die Norhyoscyaminlösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Apparatur über den Hahn evakuiert. Nach dem Schließen des Hahns wurde die Ampulle mittels eines sich in dem Glasrohr befindenden teflummantelten Metallstücks aufgeschlagen. Jetzt destillierte Methyljodid in das mit flüssigem Stickstoff gekühlte Reaktionsgefäß über. Dabei wurde die Reaktionslösung nach 30 min einmal kurz aufgetaut, leicht geschüttelt und wieder eingefroren.

Nach 90 Minuten wurde die Kühlung entfernt und die Methylierung bei Raumtemperatur unter Lichtschutz über 24 Stunden ablaufen lassen.

Die dünnschichtchromatographische Aufarbeitung erbrachte 13 MBq (0,35 mCi) ^{14}C -Hyoscyamin. Dies bedeutete eine Ausbeute von 35%, bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität. In dem Produkt ließen sich dünnschichtchromatographisch mit den Laufmitteln 2,3 und 4 bei einer Nachweisgrenze von 0,1% keine Verunreinigungen erkennen. Es glich in seinem Laufverhalten stets dem Hyoscyamin. Wegen des Ablaufs der Synthese betrug die spezifische Aktivität des ^{14}C -Hyoscyamins 2,13 GBq/mmol (57,6 mCi/mmol).

1.2. Darstellung von Hyoscyamin-Konjugaten zur Gewinnung spezifischer Antikörper

Nur Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 Dalton induzieren im Organismus die Bildung gegen sie gerichteter Antikörper. Werden aber kleine Moleküle, sogenannte Haptene, an große Strukturen wie Proteine gekoppelt, entstehen auch für sie spezifische Antikörper (LANDSTEINER, 1945). Die Art der Kopplung wirkt sich auf die Eigenschaften des entsprechenden Antiserums aus. Der Teil des Moleküls, der zur Anbindung an das Protein genutzt wird, ist gegenüber der Ausgangsverbindung stark verändert. Die Antikörper erkennen daher diesen Abschnitt nicht. Entfernt davon liegende, freie Strukturen werden dagegen sehr genau erfaßt (CHARD, 1978).

Hyoscyamin besitzt keine funktionelle Gruppe, die eine direkte Kopplung an ein Protein erlaubt. Notwendig war daher eine Derivatisierung, die auf folgende Arten durchgeführt wurde:

1. Addition von Norhyoscyamin (s. III.1.1.) an Acrylsäure ergab Norhyoscyamin-N- β -propionsäure
2. Alkylierung von Norhyoscyamin mit Chloressigsäure lieferte Norhyoscyamin-N-essigsäure
3. Veresterung von Hyoscyamin mit Bernsteinsäureanhydrid führte zu Hyoscyamin-O-bernsteinsäurehalbester

Arbeitsvorschrift der Addition von Norhyoscyamin an Acrylsäure

Zu 1,75 mmol (= 481 mg) Norhyoscyamin, gelöst in 3,0 ml waserfreiem Ethanol, wurden im Eis 3,5 mmol (= 0,24 ml) Acrylsäure getropft. Nach 13 Stunden bei 4°C verlief die Reaktion 120 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Zugabe weiterer 0,87 mmol Acrylsäure und weiteren 16 Stunden Reaktionszeit war das Norhyoscyamin vollständig umgesetzt.

Die Reinigung erfolgte auf Dickschichtplatten. Nach zweimaligem Entwickeln in Laufmittel 5 wurde die unterste, bei UV 254 nm detektierbare Zone (Rf 0,3) ausgeschabt und mit Methanol eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 363 mg Norhyoscyamin-N- β -propionsäure als leicht gelbliches Öl erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 60%. Das Produkt konnte nicht kristallisiert werden. Seine Struktur wurde durch massenspektroskopische Untersuchung und das NMR-Spektrum nachgewiesen.

Massenspektrum (EI): 347 (M^+), 330, 288, 275, 198, 182, 152, 141, 121, 110, 103, 80, 68. Für den Strukturbeweis wichtig waren besonders die Peaks mit den Massen 347 (Molekulargewicht), 288 und 182. Die beiden Bruchstücke traten bei diesen Substanzen sonst nicht auf und ließen sich mit der Carboxyethylgruppe am Stickstoff des Alkamins erklären. Nach Methylierung der Substanz mit Diazomethan und Reinigung durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel 6 ergab sich dieses Massenspektrum (EI): 361 (M^+), 330, 288, 212, 196, 166, 155, 121, 103, 80, 68. Wichtig für den Strukturbeweis waren der Molekülpeak bei 361 und die Bruchstücke 196 und 212. Sie zeigten den Zuwachs um 14 Dalton (= MG einer Methylgruppe) bei den Fragmenten, die den Stickstoff mit der Carboxyethylgruppe enthielten (182 $\rightarrow$ 196 und 198 $\rightarrow$ 212).

^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3): 1,13 - 1,36 (m, 8 H, C2-H, C4-H, C6-H, C7-H); 2,44 und 2,78 (2 t, 4 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 3,36 und 3,50 (2 br s, 2 H, C1-H, C5-H); 3,63 - 3,84 (m, 2H, CH_2OH); 4,05 - 4,21 (m, 1 H, Ph-CH); 5,04 (t, 1 H, C3-H); 7,13 - 7,35 (m, 5 H, Aromat). Das Spektrum glich dem des Hyoscyamins bis

auf das Fehlen der Methylaminogruppe bei 2,20 ppm und die zusätzlichen zwei Methylengruppen bei 2,44 ppm und 2,78 ppm. Außerdem zeigte sich der anisotropische Effekt der Carboxylgruppe durch die Verbreiterung des Multipletts, das den Methylengruppen des Tropangerüsts zuzuordnen war.

Arbeitsvorschrift der Alkylierung von Norhyoscyamin mit Chloressigsäure

Die Lösungen von 0,75 mmol (= 207 mg) Norhyoscyamin und 0,75 mmol (= 70 mg) Chloressigsäure in 10 bzw. 1,0 ml Acetonitril sowie 1,5 mmol (= 0,25 ml) Ethyldiisopropylamin wurden vereinigt und 14 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Ein weißer Bodensatz wurde abfiltriert, das Filtrat mit 0,75 mmol Chloressigsäure und 1,5 mmol Ethyldiisopropylamin versetzt. Während der nächsten 4 Tage bildete sich erneut weißer Niederschlag. Die vereinigten Produkte wurden mit Acetonitril gewaschen und getrocknet.

Erhalten wurden 187 mg, entsprechend 75% der theoretischen Ausbeute, Norhyoscyamin-N-essigsäure. Statt eines Schmelzpunkts wurde Zersetzung bei 230-245°C beobachtet. Das Produkt wurde durch Massenspektrum und NMR-Spektrum identifiziert.

Massenspektrum (EI): 333 (M^+), 316, 288, 184, 168, 127, 110, 103. 1H -NMR-Spektrum (D_2O): 1,54 - 2,50 (m, 8 H, C2-H, C4-H, C6-H, C7-H); 3,56 (s, 2 H, N-CH₂-COOH); 3,82 (t, 1 H, C1-H); 3,95 - 4,03 (m, 3 H, CH₂OH, C5-H); 4,17 - 4,25 (m, 1 H, Ph-CH); 5,11 (t, 1 H, C3-H); 7,38 - 7,47 (m, 5 H, Aromat).

Die Spektren konnten wie bei Norhyoscyamin-N- β -propionsäure gedeutet werden. Die Fragmente im Massenspektrum entsprechen den um jeweils 14 Einheiten schwereren Bruchstücken im obigen Spektrum. Das NMR-Spektrum ist gleichartig bis auf die fehlende zweite Methylengruppe. Die vorhandene Methylengruppe zeigt eine größere Verschiebung, da die Einflüsse des Stickstoffatoms und der Carboxylgruppe zusammenwirken.

Arbeitsvorschrift der Veresterung von Hyoscyamin mit Bernsteinsäureanhydrid

Vorgegangen wurde nach der Methode von FASTH et al. (1975). Die Lösung von 0,70 mmol (= 202 mg) Hyoscyamin in 2,55 ml Chloroform, getrocknet durch Filtration über wasserfreies Na_2SO_4 , wurde mit 1,4 mmol (= 140 mg) Bernsteinsäureanhydrid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf Dickschichtplatten. Nach zweimaligem Entwickeln in Laufmittel 5 und Detektion bei UV 254 nm wurde die Zone mit $R_f=0,15$ mit Methanol eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 91,7 mg Hyoscyaminhemisuccinat (34% der theoretischen Ausbeute) als leicht gelbliche, glasige Substanz erhalten.

Massenspektrum (EI): 389 (M^+), 375, 271, 205, 148, 140, 128, 124, 108, 103, 82. Das Spektrum ähnelt dem des Hyoscyamins. Wegen des Molekülpeaks bei 389 und des Fragments 271 konnte es als Nachweis für Hyoscyaminhemisuccinat dienen (vgl. FASTH et al., 1975).

Die drei Hyoscyaminderivate enthielten eine Carboxylgruppe, die eine Kopplung an ein Protein durch Bildung eines Säureamids mit dessen Aminogruppen erlaubten. Die notwendige Aktivierung der Säuregruppe geschah durch Reaktion mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC; Fa. Sigma, Deisenhofen).

Arbeitsvorschrift der Kopplung von Hyoscyaminderivaten an Rinderserumalbumin nach der Carbodiimidmethode

Die Lösung von 0,10 mmol Hyoscyaminderivat und 0,001 mmol (= 60 mg) BSA in 2,5 ml H_2O wurde mit 0,1 M NaHCO_3 auf pH 7 gebracht und in 4 Portionen mit insgesamt 0,4 mmol (= 75 mg) EDC versetzt. Nach 18 Stunden unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur im Dunklen wurde das Reaktionsgemisch 4 Tage bei 4°C gegen H_2O dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die Konjugate wurden zur Gewinnung von spezifischen Antise-

ren gemäß II.9.1. verwendet. Diese zeigten im Bindungstest mit ^3H -Hyoscyamin und besonders bei der vorläufigen Überprüfung der Spezifität gegen Hyoscyamin und Scopolamin einige Unterschiede.

Alle 5 mit dem Konjugat aus Norhyoscyamin-N- β -propionsäure immunisierten Tiere ergaben Seren mit guter Bindung. Die spezifischsten zwei Seren kamen von den Tieren, die ab der ersten Blutabnahme eine Bindung von mehr als 50% zeigten. Sie wurden für die Entwicklung des Radioimmuntests verwendet. Serum 188A bestand aus den Blutabnahmen 1,2 und 4 - 10 des einen Tieres, 160A aus den Fraktionen 1 - 4 des zweiten. Serum 188A wurde nach der Charakterisierung des Testverfahrens für alle Hyoscyaminbestimmungen verwendet. Die drei mit dem Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-BSA-Konjugat immunisierten Tiere ergaben Seren mit Bindungswerten bis 47% und etwas geringerer Spezifität. Für die Aufnahme von Vergleichswerten wurde Serum 220 verwendet, das aus der siebten Blutabnahme dieses Tieres stammte. Drei mit Hyoscyamin-N-essigsäure-Konjugat immunisierte Kaninchen lieferten Seren mit einer Bindung von höchstens 35% und ebenfalls etwas geringerer Spezifität. Für Vergleichszwecke wurde Serum 235 aus der vierten Blutabnahme ausgewählt.

1.3. Wahl geeigneter Testbedingungen

Mit dem Vorliegen von markiertem Antigen und bindungsfähigen Antiseren waren die Voraussetzungen für einen Radioimmuntest auf Hyoscyamin geschaffen. Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit sind weiterhin von verschiedenen Parametern abhängig, die für das Testsystem festgelegt werden müssen.

Zuerst wurde der optimale pH-Wert der Inkubationslösung bestimmt. Abbildung 5 zeigt die pH-Abhängigkeit der Bindung von ^3H -Hyoscyamin. Beide Seren erreichten im neutralen Bereich die höchsten Bindungswerte bei geringer unspezifischer Bindung. Für alle Hyoscyaminbestimmungen wurde daher phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung pH 7,4 verwendet.

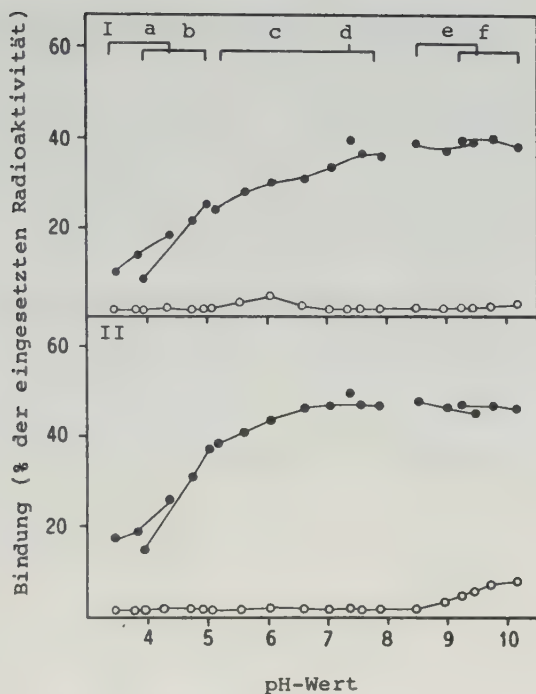


Abb. 5: Abhängigkeit der Bindung von ^3H -Hyoscyamin an die Antikörper der Seren 160A (I) und 188A (II).
 a: 0,1 M Natriumcitrat-HCl. b: 0,1 M Natriumacetat-NaOH. c: 0,08 M Natrium-Kalium-Phosphat. d: PBS.
 e: 0,1 M Tris-HCl. f: 0,1 M Glycin-NaOH.
 ●: Bindung an die Antikörper
 ○: unspezifische Bindung in Ansätzen ohne Antikörper

Im Radioimmunistest stellt sich während der Inkubation ein Gleichgewicht ein. Vor der Bestimmung der Radioaktivität muß die Trennung von ungebundenem und gebundenem Antigen erfolgen. In dieser Arbeit sollte dies durch Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Ammoniumsulfat geschehen, einem Verfahren, das sich hierfür bewährt hat (CHARD et al., 1971; WEILER und ZENK, 1976). Die geeignete Ammoniumsulfatkonzen-

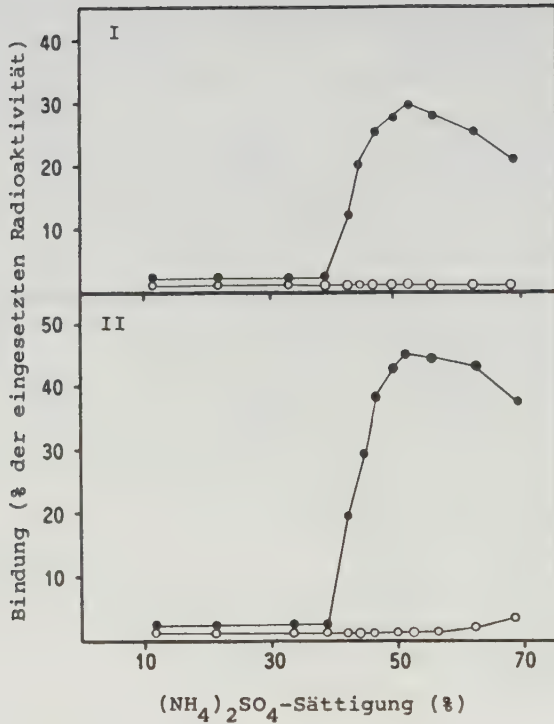


Abb. 6: Abhängigkeit der Fällung des Antigen-Antikörper-Komplexes (●) und der unspezifischen Bindung (○) von der Ammoniumsulfatsättigung im Hyoscyamin-RIA.
 I : Verwendung von Serum 160A
 II : Verwendung von Serum 188A

tration muß für jeden Radioimmuntest bestimmt werden, da sie u.a. von der Ladung des zu fällenden Komplexes abhängt.

Abbildung 6 zeigt, daß sich bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 52% zur Fällung die größte Differenz zwischen Bindung und UB-Wert ergab. Im Hyoscyamin-RIA wurde daher dem Inkubationsansatz (s. II.11.) zur Fällung 1 ml 100% gesättigter Ammoniumsulfatlösung zugesetzt.

Im nächsten Schritt muß bei jedem Radioimmunoassay der Wert für B_0 , den Anteil der gebundenen Radioaktivität an der eingesetzten Radioaktivität in Abwesenheit unmarkierten Antigens, festgelegt werden. Für den Hyoscyamin-RIA wurde $B_0 = 30\%$ gewählt. Dieser Wert bedeutete eine geringe Zahl von Antikörpern im Testansatz. Daraus folgt eine hohe Empfindlichkeit des Testsystems, da kleine Mengen unmarkierten Antigens eine Abnahme der gebundenen Radioaktivität bewirken. Der gewünschte B_0 -Wert wird durch entsprechende Verdünnung des Antiserums erreicht. Abbildung 7 zeigt die Bindung der Hyoscyaminseren in unterschiedlichen Verdünnungen.

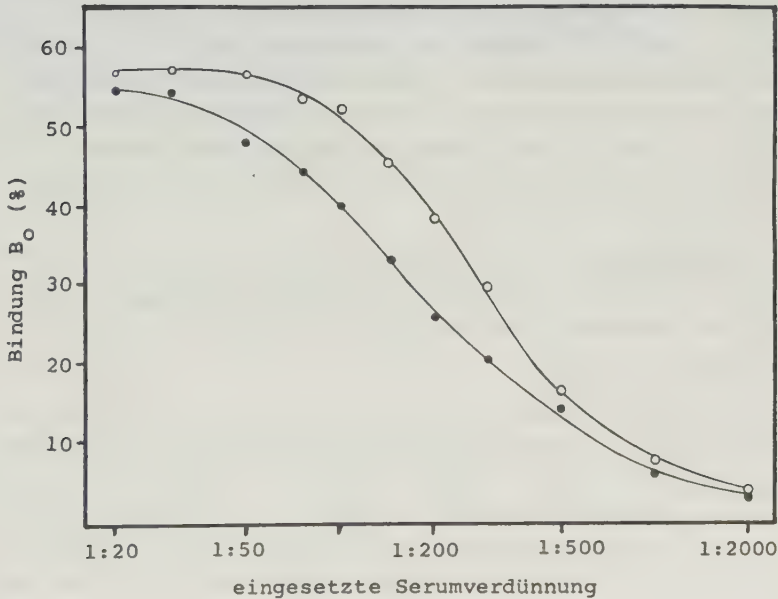


Abb. 7: Abhängigkeit der Bindung B_0 von der eingesetzten Verdünnung der Seren 160A (●) und 188A (o) im Hyoscyamin-Radioimmunttest.

Für die Verwendung von Serum 160A wurde danach eine Verdünnung von 1:170 festgelegt, das entspricht einer Endverdünnung im Test von 1:1530. Für Serum 188A betrugen die Werte 1:290 bzw. 1:2610.

Die übrigen Versuchsbedingungen konnten von anderen Testsystemen übernommen werden (KOLOSSA, 1983) und wurden bereits in II.11. beschrieben.

1.4. Standardisierung des Testverfahrens

Die quantitative Bestimmung von Hyoscyamin in unbekannten Proben war durch Vergleich mit einer Standardkurve möglich, die bei jedem Test erstellt wurde. Dafür wurden den Inkubationsansätzen verschiedene bekannte Mengen an Hyoscyamin zugesetzt. Durch die Abnahme der gemessenen Radioaktivität ergab sich die Standardkurve. Für die graphische Darstellung wurde die Antigenmenge logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen. In der Ordinate wurden die prozentuale Bindung B/B_0 bzw. für die linearisierte Darstellung die logit B/B_0 -Werte eingesetzt (vgl. II.13.).

Die Standardkurven für die Seren 160A und 188A sind in Abbildung 8 dargestellt. Daraus lassen sich wichtige Parameter des Hyoscyamin-Radioimmuntests ableiten, die in Tabelle 3 zusammengefaßt sind.

	Serum 160A	Serum 188A
Meßbereich	0,10 - 20 ng	0,025 - 4,0 ng
Nachweisgrenze	0,030 ng (= 100 fmol)	0,010 ng (= 33 fmol)
$B/B_0 = 50\%$	0,35 ng	0,11 ng
UB-Werte	2,0 %	2,0 %
Steigung der logit-Geraden	- 2,28	- 2,26

Tab. 3: Charakterisierung der Standardkurven im Hyoscyamin-Radioimmuntest.

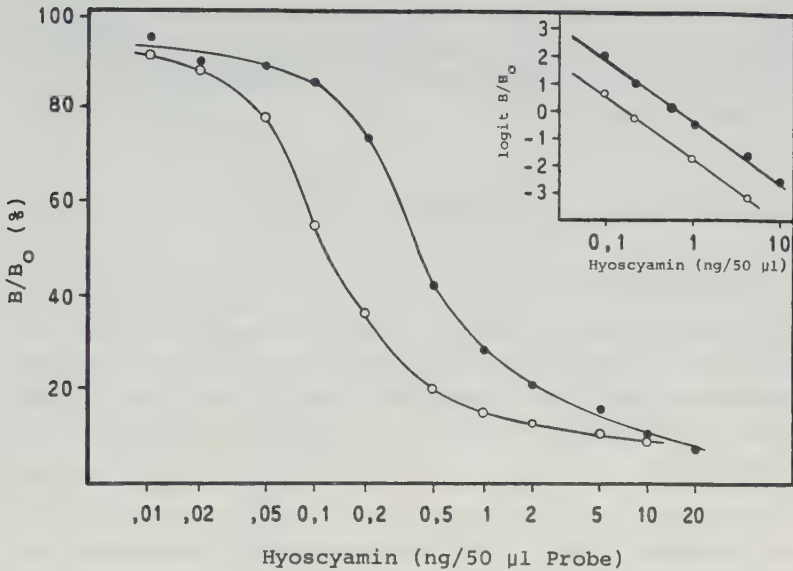


Abb. 8: Standardkurven des Hyoscyamin-Radioimmuntests bei Verwendung der Seren 160A (●) und 188A (○) in zwei möglichen Darstellungsformen.

Das Zahlenmaterial ermöglicht auch die weitere Charakterisierung der Antiseren durch die Bestimmung der Affinitätskonstante K . K ist die Gleichgewichtskonstante der Antigen-Antikörper-Reaktion und dient als Maß der Affinität des Antikörpers zum Antigen. Für die Hyoscyamin-Antiseren wurde K nach der folgenden Formel berechnet (MÜLLER, 1980):

$$K = \frac{1}{(A - A^*) \times (1 - 1,5b + 0,5b^2)}$$

A Konzentration des unmarkierten Antigens bei $B/B_0=50\%$

A^* Konzentration des markierten Antigens

b Anteil der gebundenen an der eingesetzten Radioaktivität in Abwesenheit unmarkierten Antigens

Die Werte waren $1,9 \times 10^9$ l/mol für Serum 160A und $9,8 \times 10^9$ l/mol für Serum 188A. Sie lagen somit in der Größenordnung der Affinitätskonstanten anderer Seren, die für hochspezifische Radioimmuntests verwendet wurden (WIECZOREK, 1985).

1.5. Spezifität des Testverfahrens

1.5.1. Kreuzreaktionen

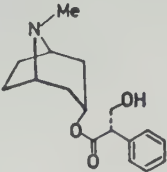
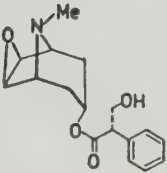
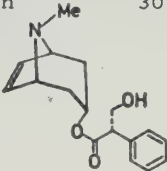
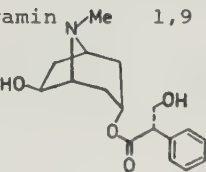
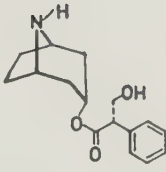
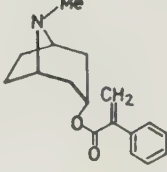
Spezifität ist eine wesentliche Anforderung an ein immunologisches Bestimmungsverfahren. Eine Messung in ungereinigten Rohextrakten kann nur durchgeführt werden, wenn die Antikörper die zu messende Substanz von ähnlichen Verbindungen unterscheiden.

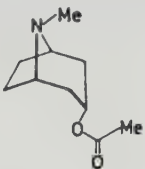
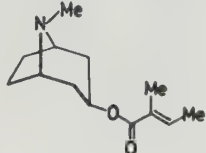
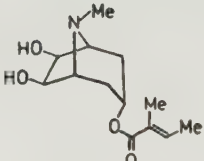
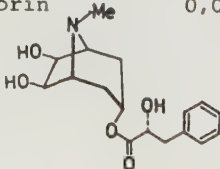
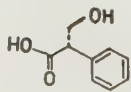
Zur Ermittlung der Kreuzreaktion KR einer Substanz wurde die Menge bestimmt, die 50% des eingesetzten ^3H -Hyoscyamins aus dem Antigen-Antikörper-Komplex verdrängt, und mit der Menge an Hyoscyamin verglichen, die ebenfalls $B/B_0 = 50\%$ bewirkte. Die Berechnung erfolgte auf molarer Basis, um für verschiedene Substanzen vergleichbare Werte zu erhalten.

$$\text{KR (\%)} = \frac{\text{Menge Hyoscyamin bei } B/B_0 = 50\%}{\text{Menge Testsubstanz bei } B/B_0 = 50\%} \times 100$$

Tabelle 4 zeigt die Kreuzreaktionen des Hyoscyamin-Radioimmuntests. Dabei wurden den Werten der Seren 160A und 188A diejenigen der Seren nach den beiden anderen Konjugatsynthesen gegenübergestellt. Das erlaubte Rückschlüsse darauf, wie sich die Wahl des Hyoscyaminderivates auf die Eigenschaften des Antikörpers auswirkte.

Tab. 4: Strukturen der Tropanalkaloide und ihre Kreuzreaktionen im Radioimmuntest zur Bestimmung von Hyoscyamin, ausgedrückt in Prozent auf molarer Basis.

Substanz	Kreuzreaktionen bei Verwendung des Serums			
	160A	188A	220	235
L-Hyoscyamin	100	100	100	100
				
Atropin	50	57	146	50
D-Hyoscyamin	0,9	15	200	0,8
Scopolamin	2,4	0,9	12	19
				
Dehydrohyoscyamin	30	5	66	9,4
				
6 β -Hydroxyhyoscyamin	1,9	1,4	26	20
				
Norhyoscyamin	8,7	5,6	0,5	15
				
Apoatropin	2,6	1,5	90	3,4
				

Substanz	Kreuzreaktionen bei Verwendung des Serums			
	160A	188A	220	235
Acetyltropin	0	0	1,7	0
				
Tigloidin	0,02	0,02	0,04	0,02
				
Meteloidin	0,02	0,02	0,21	0,03
				
Dihydroxylittorin	0,04	0,04	0,11	0,05
				
Tropin	0	0	0	0
				
Tropasäure	0	0	0	0
				

Das Norhyoscyamin-N- β -propionsäure-BSA-Konjugat lieferte hochspezifische Antikörper. Die Antiseren 160A und 188A waren gut für die Messung von Hyoscyamin in pflanzlichen Rohextrakten geeignet. Die relativ hohe Kreuzreaktivität von Dehydrohyoscyamin störte nicht, da dieses Alkaloid bisher aus keiner Pflanze bekannt geworden ist. Die Kreuzreaktivität von Norhyoscyamin war die Folge der Verknüpfung von Hapten und Protein über das Stickstoffatom. Läge in einer Probe weit mehr Norhyoscyamin als Hyoscyamin vor, wären die Ergebnisse irreführend. Norhyoscyamin bildet aber im Alkaloidgemisch der Solanaceen nur einen untergeordneten Bestandteil. In einzelnen Fällen wurde ein etwa gleicher Gehalt beider Alkaloide beschrieben (LEETE, 1959; EVANS, 1979). Das Serum 160A unterschied streng zwischen den Enantiomeren des Hyoscyamins. Es könnte deshalb für Fragestellungen eingesetzt werden, bei denen ausschließlich die physiologisch wirksame L-Form bestimmt werden soll. Serum 188A erkannte dagegen den Alkamanteil des Hyoscyamins etwas spezifischer. Es diskriminierte stärker die nahe verwandten Strukturen von Hyoscyamin, 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin und wurde für die Bestimmungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Das Serum 235, entstanden nach Immunisierung mit Norhyoscyamin-N-essigsäure-BSA-Konjugat, war ebenfalls nur gegen die L-Hyoscyamin gerichtet. Die Kreuzreaktivität der Alkaloide mit sehr ähnlichem Alkamanteil war recht hoch. Wegen der kürzeren Brücke zum Protein dürfte dieser Molekülteil im Immunogen für die Antikörper schwerer erkennbar sein. Erst die Immunisierung weiterer Tiere könnte zeigen, ob auch hier hochspezifische Antiseren möglich wären.

Durch Verwendung des Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-BSA-Konjugats entstand das Antiserum 220. Wegen der Wahl der Verknüpfung reagierte es nicht spezifisch mit L-Hyoscyamin. Nicht zu erwarten waren dagegen die Kreuzreaktivitäten von Alkaloiden mit leicht verändertem Alkamanteil.

1.5.2.Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurven

Wird in einem Rohextrakt nur die zu bestimmende Substanz gemessen, muß eine Verdünnungskurve des Extrakts parallel zur Standardkurve verlaufen. Der Nachweis der Parallelität dient als weiterer Hinweis auf die Spezifität des Testsystems (CEKAN, 1975). Der Nachweis kann durch Vergleich der Steigungen der entsprechenden Geraden nach logit-Transformation geführt werden. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse für die benutzten Hyoscyamin-Antiseren, deren Spezifität bestätigt wurde. Verwendung fanden die Rohextrakte einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger und eines Blattes von Datura sanguinea.

Serum	Steigung der linearisierten Form der	
	Standardkurven	Extraktverdünnungskurven
160A	- 2,28	- 2,21 / - 2,31
188A	- 2,26	- 2,23 / - 2,25

Tab. 5: Vergleich der Steigung von Standard- und Extraktverdünnungskurven im Hyoscyamin-Radioimmunttest.

2. Enzymimmuntest für Scopolamin

2.1. Testprinzip des Enzymimmuntests

Der Begriff des Enzymimmuntests umfaßt alle Verfahren, in denen der Verlauf einer Antigen-Antikörper-Reaktion mittels der Markierung eines Reaktionspartners durch ein Enzym für die Messung sichtbar gemacht wird. Eigenschaften wie Markierung des Antigens oder des Antikörpers, kompetitiver oder nicht kompetitiver Test und Quantifizierung von Antigen oder Antikörper unterscheiden die Testprinzipien, die häufig noch durch Einsatz eines zweiten und dritten Antikörpers in weiteren Reaktionsschritten abgewandelt werden (MAGGIO, 1980).

Für die quantitative Bestimmung von Haptenen ist das Spektrum der Möglichkeiten eingeschränkt. Da die gleichzeitige Bindung von zwei oder mehr Antikörpern an ein Haptenmolekül als Antigen nicht möglich ist, scheiden alle Testprinzipien dieser Art aus.

Verschiedenste Lösungen wurden für die notwendige Trennung zwischen freier und gebundener Phase nach der Antigen-Antikörper-Reaktion gefunden. Das Spektrum reicht von der konventionellen Zentrifugation bis zur Fixierung der Antikörper an eisenhaltigen Gelpartikeln und deren Abtrennung aus der Lösung durch magnetische Anziehungskräfte (SMITH und GEHLE, 1977). Die größte Verbreitung fand der Festphasen-Enzymimmuntest (ELISA) (ENGVALL und PERLMANN, 1971). Dabei wird ein Reaktionspartner an der der Kunststoffoberfläche des Reaktionsgefäßes adsorbiert. Nach der Inkubation kann der Überstand durch einfaches Ausgießen und Waschen vom Antigen-Antikörper-Komplex getrennt werden. Der gebundene Anteil verbleibt im Gefäß und kann dort quantifiziert werden. Die Vorteile des ELISA kommen durch die Verwendung der Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen besonders zur Geltung. Durch sie besteht vom ersten Pipettierschritt bis zur Messung der Extinktionen eine Einheit von 96 Proben. Das Hantieren mit einer großen Zahl einzelner Gefäße entfällt. Dies spart Zeit,

verringert die Gefahr von Verwechslungen und verbessert die Gleichmäßigkeit aller Werte eines Tests.

Für den Festphasen-Enzymimmuntest zur Bestimmung einer niedermolekularen Substanz bestehen zwei Möglichkeiten. Das Hapten kann an die Kunststoffoberfläche gebunden werden. Im nächsten Schritt ist die Bindung spezifischer Antikörper an die Oberfläche dann umgekehrt abhängig von der Konzentration freien Haptens in der Inkubationslösung. Beim zweiten Testprinzip konkurrieren freies Antigen aus der Probe und enzymmarkiertes Antigen um wandständige Antikörper. Die gebundene Enzymaktivität ist wieder umgekehrt abhängig von der Menge des zu bestimmenden Moleküls. Das zuletzt genannte Prinzip wurde im Scopolamin-Enzymimmuntest verwirklicht.

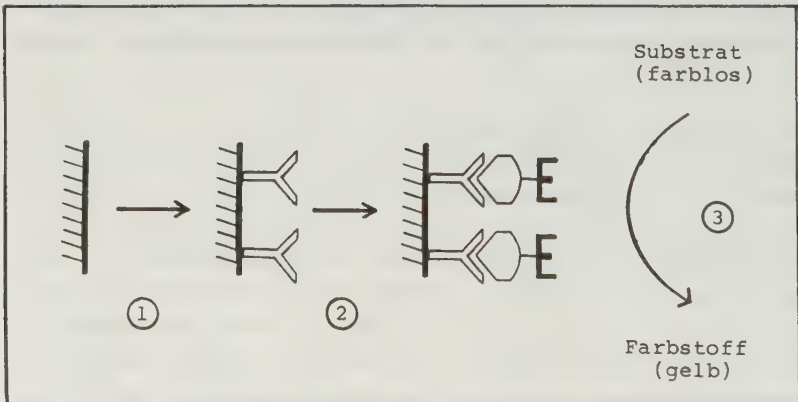
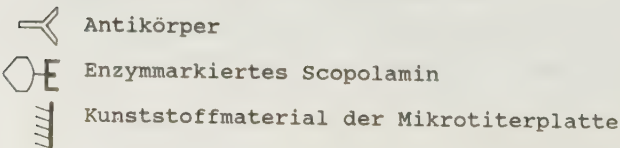


Abb. 9: Prinzip des Scopolamin-Enzymimmuntest

- ① Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Antikörper
- ② Kompetitive Immunreaktion mit freiem und enzymmarkiertem Scopolamin
- ③ Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität durch photometrische Endpunktmessung



2.2. Herkunft der spezifischen Antikörper gegen Scopolamin

Im Rahmen dieser Arbeit standen Antiseren zur Verfügung, die schon zur Vorbereitung der Veröffentlichung von WEILER et al. (1981b) dienten. Vor der Verwendung im Enzymimmuntest wurde die Immunglobulinfraktion gereinigt wie in II.9.2. beschrieben.

2.3. Synthese des enzymmarkierten Scopolaminderivates

Für die Darstellung des Enzymtracers stand Norscopolamin-N- β -propionsäure aus der oben angeführten Untersuchung bereit. Die Vorschrift zur Kopplung an alkalische Phosphatase richtete sich nach der bei WEILER et al. (1981a) angegebenen Methode, die von Frau Brockhaus am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München für einen Scopolamin-enzymimmuntest unter anderen Testbedingungen erprobt wurde. Die Aktivierung der Carboxylgruppen des Scopolaminderivates durch EDC ermöglichte dabei ihre Reaktion mit Aminogruppen des Rinderserumalbumins.

Arbeitsgang der Synthese des Scopolamin-AP-Konjugats:

0,03 mmol (= 10,83 mg) Norscopolamin-N- β -propionsäure wurden in 0,3 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung mit 0,3 ml H₂O langsam verdünnt. Nach Zugabe von 0,045 mmol EDC als Lösung in 0,3 ml H₂O unter leichtem Rühren wurde mit 0,01 N NaOH auf pH 6,4 eingestellt. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz eine Stunde gerührt, dann in Aliquots von 0,06 ml innerhalb von 90 min zur Lösung der alkalischen Phosphatase gegeben. Diese bestand aus 0,30 ml Enzymlösung (= 3,0 mg Protein = 7500 U) und 0,6 ml der Mischung von gleichen Teilen Dimethylformamid und H₂O, eingestellt auf pH 6,4. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren im Dunklen über 15 Stunden. Das Produkt wurde bei 4°C dialysiert, zunächst 8 Stunden gegen 2 l Dimethylformamid 10%,

dann 3 Tage gegen 5 l TBS. Der Ansatz wurde dann lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

Bei diesem Vorgehen blieb die eingesetzte Enzymaktivität zu 65% erhalten.

2.4. Wahl geeigneter Testbedingungen

Bei einem Enzymimmunttest nach dem in II.12.2. beschriebenen Schema müssen eine Reihe von Parametern festgelegt werden. Konnte in Bezug auf Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Beschichtung der Mikrotiterplatten auf die Vorarbeiten von Frau Brockhaus und allgemeine Erfahrungen mit ELISA-Verfahren (LOEVBOG, 1984) zurückgegriffen werden, so war für andere Bedingungen eine gründliche Optimierung nötig, um einen zuverlässig reproduzierbaren Enzymimmunttest für Scopolamin zu erhalten.

Die notwendige Konzentration der Antikörperlösung zum Beschichten der Mikrotiterplatten läßt sich aus deren Bindungskapazität für Proteine von ungefähr 400 ng/cm^2 ableiten. Die Konzentration von $0,005 \text{ mg/ml}$ reicht aus, um genügend Protein zur bestmöglichen Beschichtung einer Oberfläche von $1,5 \text{ cm}^2$ pro Napf bereitzustellen.

Die Zusammensetzung der Testpuffer I und II beeinflusste die unspezifische Bindung, die Bindung des Enzymtracers an den Antikörper und damit die erreichten Extinktionswerte sowie die Gleichmäßigkeit der Meßwerte für identische Proben. Für den Scopolamin-ELISA ergaben Versuche mit tris- und phosphatgepufferten Testpuffern der pH-Werte 7,8 und 7,4 keine günstigen Ergebnisse. Erst der Zusatz von Natriumchlorid und BSA bewirkte niedrigere UB-Werte, und die Verwendung von Tween 80 in Testpuffer I sorgte für gute Gleichmäßigkeit der Meßwerte. Tabelle 6 faßt die Ergebnisse zusammen.

Wegen der günstigen und reproduzierbaren Ergebnisse wurde für den Scopolamin-ELISA stets die Kombination von PBS mit

Testpuffer	UB	Standardabweichung der B_0 -Werte
I+II: 0,05 M Tris pH 7,8	0,151	sd = 19,8% (n=12)
I+II: TBS	0,137	sd = 20,4% (n=12)
I : TBS+2%BSA II: TBS	0,100	sd = 8,0% (n=12)
I : TBS+0,1% Tween 80 II: TBS	0,121	sd = 4,4% (n=12)
I : TBS+2%BSA+0,1%Tween80 II: TBS	0,085	sd = 5,2% (n=12)
I : II+2%BSA+0,1%Tween80 II: TBS+8,8mg/ml NaCl	0,065	sd = 2,9% (n=24)
I+II: PBS	0,203	sd = 14,6% (n=12)
I : PBS+2%BSA+0,1%Tween80 II: PBS	0,070	sd = 7,6% (n=12)
I : II+2%BSA+0,1%Tween80 II: PBS+8,8mg/ml NaCl	0,066	sd = 2,3% (n=32)
I : II+2%BSA+0,1%Tween80 II: PBS+44mg/ml NaCl	0,060	sd = 8,3% (n=24)

Tab. 6: Einfluß verschiedener Testpuffer auf unspezifische Bindung UB und die Gleichmäßigkeit der Bindung in Abwesenheit unmarkierten Antigens im Scopolamin-Enzymimmunttest.

zusätzlichen 8,8 mg/ml NaCl, 2% BSA sowie 0,1% Tween 80 als Testpuffer I und PBS mit verdoppelter NaCl-Konzentration als Testpuffer II verwendet.

Eine wichtige Größe für den Enzymimmunttest ist die eingesetzte Menge des Enzymtracers. Wird diese erhöht, kann durch Verkürzung der Inkubationsdauer für die Substratreaktion der Zeitaufwand für den Test verringert werden. Allerdings nimmt gleichzeitig die Empfindlichkeit des Testsystems merklich ab.

Die Konzentration der Lösung des Norscopolamin-N- β -propionsäure-AP-Konjugats wurde so gewählt, daß unter den angegebenen Bedingungen die Extinktion B_0 in Abwesenheit unmarkierten Antigens einen Wert zwischen 0,7 und 0,9 annahm. Die Bestimmung erfolgte, indem die B_0 -Werte für steigende Konzentrationen des Enzymtracers unter den Testbedingungen gemessen wurden. Nach Auftragung der erreichten Extinktionen gegen die verwendeten Konzentrationen konnte der benötigte Wert abgelesen werden. Für jede Charge des Enzymtracers mußte die betreffende Konzentration festgelegt werden. Die Abbildung 10 zeigt diese Auswertung.

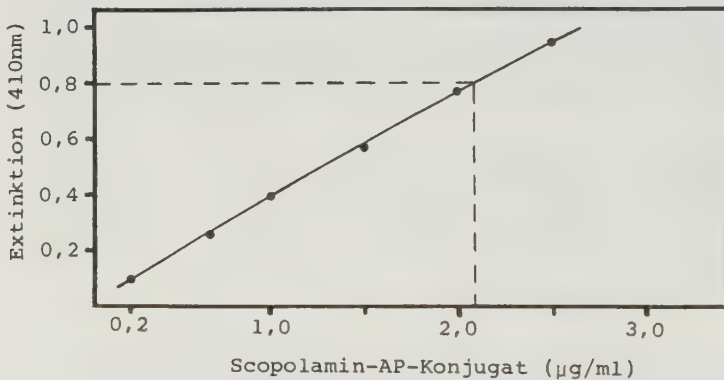


Abb. 10: Ermittlung der notwendigen Konzentration des Scopolamin-AP-Konjugats für den Enzymimmuntest.

2.5. Standardisierung des Testverfahrens

Die quantitative Bestimmung im Enzymimmunttest erfolgte durch eine Standardkurve, die auf jeder Testplatte mitgeführt wurde. Ihre Aufnahme und Darstellung entsprach dem Verfahren im Radioimmunttest, das unter III.1.4. beschrieben wurde. Die gemessenen Extinktionswerte ersetzen für die Auswertung die im Antigen-Antikörper-Komplex gebundene Radioaktivität.

Die Abbildung 11 zeigt die Standardkurve des Scopolamin-Enzymimmunttests. In Tabelle 7 sind die Daten zu ihrer Charakterisierung zusammengefaßt.

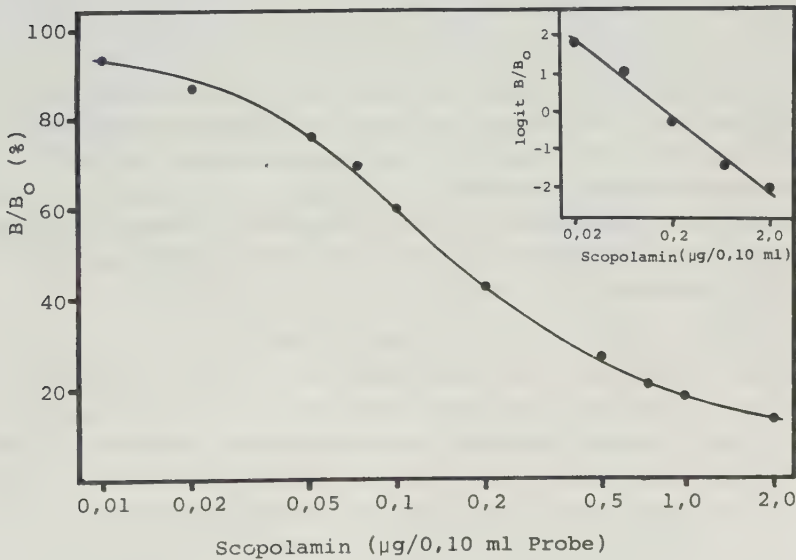


Abb. 11: Standardkurve des Scopolamin-Enzymimmunttests in zwei möglichen Darstellungsformen.

Meßbereich	Nachweis- grenze	$B/B_0 = 50\%$	UB-Wert	Steigung der logit-Geraden
0,02 - 2 ng	15 pg = 52 fmoI	0,18 ng	0,06	- 2,20

Tab. 7: Charakterisierung der Standardkurve im Scopolamin-Enzymimmunttest.

2.6. Spezifität des Testverfahrens

2.6.1. Kreuzreaktionen

Die Ermittlung der Kreuzreaktionen geschah wie im Radioimmunttest durch Bestimmung der Menge der Testsubstanz, die 50% des markierten Antigens, hier des Enzymtracers, aus der Antikörperbindung verdrängte (vgl. III.1.5.1). Die Tabelle 8 bringt die Zusammenfassung der Ergebnisse und stellt sie den Ergebnissen des Scopolamin-Radioimmunttests (WEILER et al., 1981b) gegenüber.

Die Werte zeigten eine prinzipielle Übereinstimmung für die beiden Testsysteme. Die Antikörper erkannten das Scopolaminmolekül mit hoher Spezifität. Schon kleine Abweichungen im Bau des Alkaminteils wie im Hyoscyamin oder im Säureteil wie bei Aposcopolamin verringerten die Bindung erheblich. Die hohe Kreuzreaktivität von Norscopolamin war unvermeidlich, da das Stickstoffatom im immunogenen Konjugat zur Kopplung an das Protein benutzt wurde. Dieser Molekülteil konnte daher von den Antikörpern nicht ganz genau erfaßt werden.

Substanz	Kreuzreaktivität	
	im ELISA	im RIA
Scopolamin	100	100
Hyoscyamin	0	0,8
Atropin	0	0,7
Aposcopolamin	2,5	-
Norscopolamin	53	160
6 β -Hydroxyhyoscyamin	2,3	10,4
Dehydrohyoscyamin	0,5	1
Meteloidin	0	0
Dihydroxilittorin	0	0
Tigloidin	0	0
Acetyltropin	0	0
Scopin	0	0
Tropin	0	0
Tropasäure	0	0

Tab. 8: Tropanalkaloide und ihre Kreuzreaktionen in den Immuntests zur Bestimmung von Scopolamin, ausgedrückt in Prozent auf molarer Basis. Die Strukturformeln wurden unter III.1. gezeigt. Die Konzentration betrug im RIA 5,2 ng, im ELISA 140 pg Scopolamin pro Testansatz für $B/B_0 = 50\%$.

2.6.2. Parallelität von Extraktverdünnungs- und Standardkurve

Wie für den Hyoscyamin-Radioimmuntest erfolgte als weitere Prüfung auf die Spezifität des Scopolamin-ELISA der Vergleich von Extraktverdünnungs- und Standardkurve (vgl. III.1.5.2.). Das Ergebnis ergab für die linearisierte Form der Standardkurve eine Steigung von -2,20. Die entsprechenden Werte für die Rohextrakte waren -2,10 und -2,15. Die gute Übereinstimmung des Verlaufs der beiden Kurven verhieß korrekte Ergebnisse der Scopolaminbestimmung in pflanzlichen Materialien.

2.6.3. Korrelation der Ergebnisse von Enzymimmunttest und Radioimmunttest für Scopolamin

Die Untersuchungen zur Standardisierung und Spezifität des Scopolamin-ELISA ließen seine Eignung für phytochemische Untersuchungen erkennen. Seine Zuverlässigkeit wurde durch den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen des Radioimmunttests überprüft. 79 Blattextrakte von Duboisia-Hybriden wurden mit beiden Verfahren auf ihren Scopolamingehalt hin untersucht. Die Abbildung 12 zeigt die Korrelation der Werte. Die Steigung der Regresionsgeraden ($m = 1,09$) in Verbindung mit dem hohen Wert für den Regressionsfaktor belegte die gute Übereinstimmung der beiden Methoden. Nachdem WEILER et al. (1981b) die Vergleichbarkeit des Radioimmunttests mit einem gebräuchlichen, dünnschichtchromatographischen Verfahren gezeigt hatten, war dies damit auch für den Scopolamin-Enzymimmunttest gesichert.

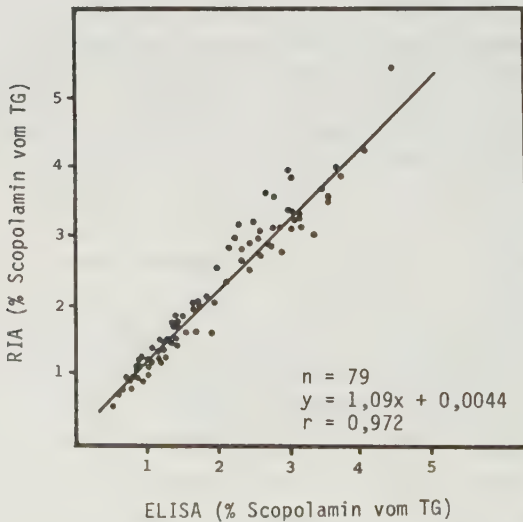


Abb. 12: Korrelation zwischen Radioimmunttest und Enzymimmunttest zur Bestimmung von Scopolamin.

3. Enzymimmuntest für Hyoscyamin

3.1. Darstellung von enzymmarkierten Hyoscyaminderivaten

Wie für Scopolamin sollte aufbauend auf dem Radioimmuntest ein Enzymimmuntest entwickelt werden. Das Prinzip des kompetitiven Tests wurde beibehalten, die radioaktive Markierung des Antigens durch die Kopplung an alkalische Phosphatase ersetzt (vgl. III.2.1.).

Für die Synthese des enzymmarkierten Hyoscyamins standen die drei Derivate zur Verfügung, deren Darstellung in III.1.2. beschrieben wurde. Die Kopplung der Norhyoscyamin-N- β -propionsäure an die alkalische Phosphatase erfolgte wie in III.2.3. für das Scopolamin-AP-Konjugat erklärt. Für Norhyoscyamin-N-essigsäure und Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-ester wurde die folgende Arbeitsvorschrift gewählt:

Die Lösung von 0,010 mmol Hyoscyaminderivates in 1,7 ml 0,05 M Phosphatpuffer pH 7 wurde auf pH 6,6 eingestellt. 0,10 ml der Lösung der alkalischen Phosphatase (= 1,0 mg Protein = 2500 U) und 5 mg EDC wurden zugesetzt und die Reaktion unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur im Dunklen über 18 Stunden ablaufen lassen. Das Produktgemisch wurde bei 4°C 3,5 Tage lang gegen TBS dialysiert, durch Zusatz von 2 mg/ml BSA stabilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

Die Ausbeute, bezogen auf die eingesetzte Enzymaktivität, betrug bei dem zweiten Verfahren 80% - 90% gegenüber 65% in der Gegenwart von Dimethylformamid.

3.2. Wahl geeigneter Testbedingungen

Der prinzipielle Ablauf des Enzymimmuntests wurde in II.12.2. beschrieben. Die benötigten Antikörper wurden nach der Methode von HURN und CHANTLER (1980) (s. II.9.2.) aus dem Antiserum 188A gereinigt, das im Hyoscyamin-Radioimmuntest erprobt wurde. Sie wurden mit 5 μ g/ml in Natriumkarbonatpuffer pH 9,6 zur Beschichtung der Näpfe der ELISA-Platten einge-

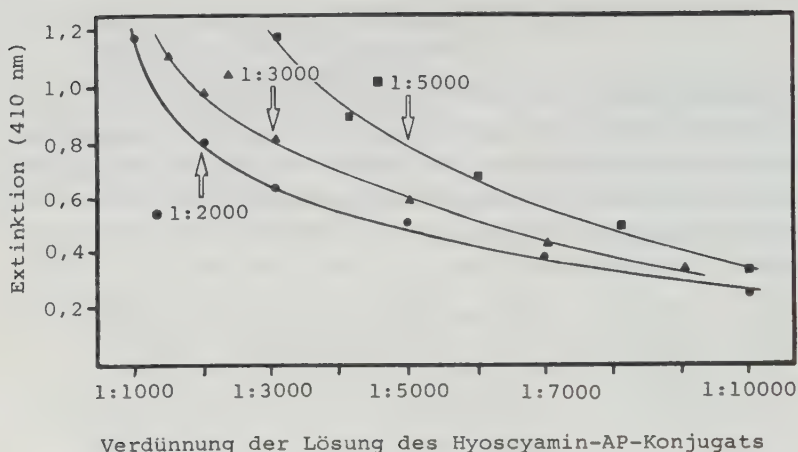


Abb. 13: Ermittlung der notwendigen Verdünnungen der Hyoscyamin-AP-Konjugate für den Enzymimmuntest, ausgehend vom den Produkten der Synthesen nach III.3.1. bzw. einer Stocklösung 2 mg/ml von Norhyoscyamin-N-β-propionsäure-AP-Konjugat.
 ● Norhyoscyamin-N-β-propionsäure-AP-Konjugat
 ▲ Norhyoscyamin-N-essigsäure-AP-Konjugat
 ■ Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP-Konjugat

setzt. Vorversuche mit verschiedenen Puffern zeigten, daß die Kombination der Testpuffer I und II des Scopolamin-Enzymimmuntests auch hier niedrige UB-Werte und gleichmäßige B_0 -Werte lieferte (vgl. III.2.4.).

Unter den gewählten Bedingungen sollte die gemessene Extinktion für die Bindung B_0 (in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen) Werte zwischen 0,7 und 0,9 annehmen. Die notwendige Verdünnung der Lösungen der Hyoscyamin-AP-Konjugate wurde durch Aufnahme der B_0 -Werte mit einer Konzentrationsreihe jedes Enzymtracers bestimmt. Die Abbildung 13 faßt die Ergebnisse zusammen.

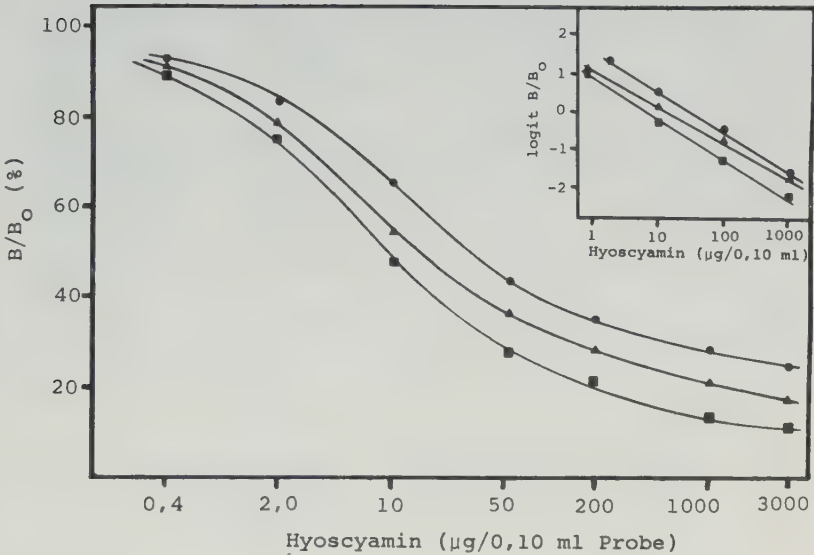


Abb. 14: Standardkurven im Hyoscyamin-Enzymimmunttest bei Verwendung verschiedener Hyoscyamin-AP-Konjugate.
 ● Norhyoscyamin-N- β -propionsäure-AP
 ▲ Norhyoscyamin-N-essigsäure-AP
 ■ Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP

3.3. Standardisierung des Testverfahrens

Die Standardkurven des Hyoscyamin-Enzymimmunttests mit den verschiedenen Formen markierten Antigens zeigt die Abbildung 14. In Tabelle 9 sind die wichtigsten Parameter zusammengefaßt. Sie zeigen, daß der Enzymimmunttest zur Bestimmung von Hyoscyamin mindestens um den Faktor 10000 weniger empfindlich ist als der Radioimmunttest.

Ausgeschlossen konnte werden, daß sich die isolierte Immunglobulinfraction in Hinblick auf die Spezifität und die

Hyoscyamin-Enzymimmunttest bei Verwendung von
Tracer 1 Tracer 2 Tracer 3

Meßbereich	2-2000 µg	0,4-3000 µg	0,4-1000 µg
Nachweisgrenze	1,0 µg	0,2 µg	0,2 µg
B/B ₀ = 50%	30 µg	12 µg	8,0 µg
UB - Wert	0,07	0,05	0,06
Steigung der logit-Geraden	- 1,05	- 0,95	- 1,15

Tab. 9: Charakterisierung der Standardkurven im
Hyoscyamin-Enzymimmunttest
Tracer 1: Norhyoscyamin-N-β-propionsäure-AP
Tracer 2: Norhyoscyamin-N-essigsäure-AP
Tracer 3: Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP

Affinität der Antikörper vom ungereinigten Antiserum unterschied. In einem Radioimmunttest wurde statt der Verdünnung des Antiserums eine Lösung der Antikörperfraktion eingesetzt. Die Eigenschaften der erhaltenen Standardkurve stimmten mit den unter III.1. für den Hyoscyamin-Radioimmunttest beschriebenen Parametern überein.

Der Grund für die geringere Empfindlichkeit des Testsystems mußte also in den unterschiedlichen immunologischen Eigenschaften von freiem Hyoscyamin und Hyoscyamin-AP-Konjugaten liegen. Die Bindung des enzymmarkierten Hyoscyamins an die Antikörper war bevorzugt gegenüber der Bindung freien Hyoscyamins. Dadurch wurde die kompetitive Hemmung der Bindung des Enzymtracers durch geringe Mengen des Alkaloids gestört.

Die Struktur der Brücke zum Protein im Hyoscyamin-N-β-propion-säure-AP-Konjugat glich der im verwendeten Immunogen. Antikörper mit besonderer Affinität zu dieser Brücke bevor-

zugen die Bindung zum Enzymtracer und könnten die höhere Nachweisgrenze erklären. Ein Vergleich der Kreuzreaktivität von Norscopolamin im Scopolamin-Radioimmunttest (160%) mit der von Norhyoscyamin im Hyoscyamin-Radioimmunttest (5,6%) deutete darauf hin, daß das Hyoscyamin-Antiserum die Methylengruppen erfaßt. Eine völlige Erklärung der Eigenschaften des Hyoscyamin-ELISA lieferte diese Beobachtung jedoch nicht. Sowohl das Hyoscyamin-AP-Konjugat mit der um eine Methylengruppe kürzeren Brücke als auch das Konjugat, bei dessen Synthese eine andere Verknüpfungsstelle und eine abweichende Struktur der Brücke gewählt wurde, können von diesen Antikörpern nicht bevorzugt erkannt werden. Dennoch lag auch bei Verwendung dieser markierten Antigene die Nachweisgrenze für Hyoscyamin viel höher als im Radioimmunttest.

3.4. Kreuzreaktionen

Wie früher beschrieben (vgl. III.1.5.1) wurden für den Enzymimmunttest die Kreuzreaktionen einiger Tropanalkaloide bestimmt, um die Spezifität des Testsystems zu untersuchen. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Werte für die Kreuzreaktivitäten lagen höher als im Radioimmunttest, für den die gleichen Antikörper eingesetzt wurden.

Apoatropin, dessen Kreuzreaktivität besonders auffallend angestiegen war, entsteht leicht durch Wasserabspaltung aus Hyoscyamin. Diese Reaktion könnte auch im Hyoscyamin-N- β -propionsäure-AP-Konjugat ablaufen. Ein solcher "falscher" Enzymtracer lag aber wohl nicht vor, da die Kreuzreaktivität sich bei der Verwendung des Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP-Konjugats nicht wesentlich änderte. Hier war die OH-Gruppe in die Brücke zum Protein einbezogen und die Wasserabspaltung im markierten Antigen nicht möglich.

Die Unterschiede zwischen Radioimmunttest und Enzymimmunttest mußten durch das Antiserum selbst verursacht sein. Unter den Bedingungen des ELISA, vielleicht durch die Wechselwirkung

mit der Kunststoffoberfläche, änderten sich seine Bindungseigenschaften. Ein sehr ähnliches Verhalten im Hyoscyamin-Enzymimmuntest zeigten auch die übrigen Antiseren, die für den Radioimmuntest erprobt worden waren (vgl. III.1.).

Substanz	Kreuzreaktionen bei Verwendung von	
	Tracer 1	Tracer 3
L-Hyoscyamin	100	100
Atropin	102	56
D-Hyoscyamin	96	3,2
Scopolamin	3,0	3,8
Dehydrohyoscyamin	74	66
6 β -Hydroxyhyoscyamin	17	15
Norhyoscyamin	37	25
Apoatropin	140	130
Acetyltropin	8,3	0,8
Tigloidin	0,3	0,3
Meteloidin	0,2	0,3
Dihydroxilittorin	0,2	0,2
Tropin	17,4	32
Tropasäure	0	0

Tab. 10: Tropanalkaloide und ihre Kreuzreaktionen im Enzymimmuntest zur Bestimmung von Hyoscyamin, ausgedrückt in Prozent auf molarer Basis. Die Strukturformeln wurden unter III.1. gezeigt. Die Konzentration betrug für Tracer 1 (Norhyoscyamin-N- β -propionsäure-AP) 35 μ g, für Tracer 3 (Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP) 10 μ g Hyoscyamin pro Testansatz für $B/B_0 = 50\%$.

4. Zusammenfassung der wichtigsten Testparameter

Die wichtigsten Eigenschaften der immunologischen Bestimmungsverfahren für die Tropanalkaloide Scopolamin und Hyoscyamin sind in der Tabelle 11 zusammengestellt.

Für die Bestimmung der Wiederfinderate wurde tropanalkaloid-freies Drogenmaterial (Herba convallariae) und getrocknetes, pulverisiertes Material aus einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger vor der Extraktion mit einer bekannten Menge des Alkaloids versetzt. Die Bestimmung des "scheinbaren" Alkaloidgehalts erlaubte die Berechnung der Wiederfinderate. Bei Hyoscyamus niger wurde der natürliche Alkaloidgehalt durch eine gleich behandelte Probe ohne Alkaloidzusatz ermittelt und vor der Berechnung abgezogen.

Zur Ermittlung der Variabilität wurde ein Extrakt aus Wurzelmaterial von Hyoscyamus niger bereitet und für die beiden Tests entsprechend verdünnt. Diese Verdünnung wurde in vier Tests an vier verschiedenen Tagen mit 50 Doppelproben auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. Die Standardabweichung der 50 Werte wurde für jeden Test berechnet. Der Mittelwert dieser vier Werte ergab die Variabilität im Test.

Vier weitere Tests dienten der Bestimmung des Gehalts der Verdünnung mittels zweier Doppelproben. Für alle acht Tests wurde der Mittelwert des Gehalts berechnet. Die Standardabweichung dieser acht Werte lieferte die Variabilität zwischen den Tests.

Scopolamin konnte in pflanzlichen Rohextrakten sowohl mit dem Radioimmuntest als auch mit dem Enzymimmuntest gemessen werden. Die höhere Empfindlichkeit des Enzymimmuntests ist vor allem durch die relativ niedrige spezifische Aktivität

Tab. 11: Eigenschaften der immunologischen Bestimmungsverfahren für Scopolamin und Hyoscyamin.

	Bestimmung von Scopolamin durch RIA		Bestimmung von Hyoscyamin durch RIA	
	ELISA		ELISA	
Meßbereich	1,5 - 100 ng	0,02 - 2 ng	0,10 - 20 ng	0,4 - 1000 µg
Nachweisgrenze	0,8 ng	15 pg	30 pg	0,2 µg
Steigung der linearisierten Standardkurve	- 2,40	- 2,20	- 2,26	- 1,15
Affinitätskonstante des Serums	1,65 x 10 ⁸ l/mol		9,8 x 10 ⁹ l/mol	
Serumverdünnung im Test	1:1305	--	1:2610	--
spez. Aktivität des Tracers	41,9 MBq/mmol	--	3,15 TBq/mmol	--
Tracer pro Testansatz	13,3 pmol (5000 cpm)	--	0,18 pmol (5000 cpm)	--
Wiederfinderate	98%	104 %	105 %	115 %
Variabilität innerhalb des Tests	4,1 %	5,5 %	4,5 %	5,8 %
Variabilität zwischen den Tests	10 %	12 %	9,4 %	21 %

des ^3H -Scopolamins zu begründen. Um diesen Vorteil und die einfachere Durchführung zu nutzen, wurde routinemäßig der Enzymimmunttest verwendet. Der Radioimmunttest diente zur Kontrolle einzelner Meßreihen. Die Bestimmung von Hyoscyamin erfolgte stets mit dem Radioimmunttest. Der Enzymimmunttest war wegen der geringeren Spezifität und Empfindlichkeit des Testsystems für diese ungereinigten Extrakte weniger geeignet.

Die Empfindlichkeit der verwendeten Testsysteme war sehr hoch. Der Nachweis von fmol-Mengen der Alkaloide war möglich, zur quantitativen Bestimmung des Alkaloidgehaltes genügten sehr geringe Probenmengen. Anschaulich wird dies durch ein Beispiel: Wurde ein Blattstück mit 1 mg Trockengewicht in 1 ml extrahiert, so konnte ein Alkaloidgehalt von $10^{-4}\%$ quantifiziert werden. Dies bedeutete auch, daß der Alkaloidgehalt einer einzelnen Pflanzenzelle (angenommener Durchmesser 80 μm , Gehalt 0,1% TG) nachweisbar wäre.

Auch die Alkaloidgehalte homöopathischer Zubereitungen konnten quantifiziert werden. Belladonna D4 bis D6 sind beispielsweise gebräuchliche Mittel bei Neuralgien (WÜRSTEL, 1986). Dilutionen dieses Präparats in den Potenzen D4 und D6 (Fa. DHU, Karlsruhe) enthielten 48 ng/ml bzw. 0,41 ng/ml Hyoscyamin. In der Dilution Hyoscyamus D4 (Fa. DHU) wurden 6,1 ng/ml Hyoscyamin und 0,8 ng/ml Scopolamin gemessen.

Die immunologischen Verfahren übertrafen auch den historisch wichtigen und lange Zeit empfindlichsten aller Alkaloidnachweise. Atropin und verwandte Alkaloide wurden dazu in das Auge einer Katze eingebracht. TONNESEN (1948) gibt als Mindestdosis für eine deutliche Pupillenerweiterung 10 ng an.

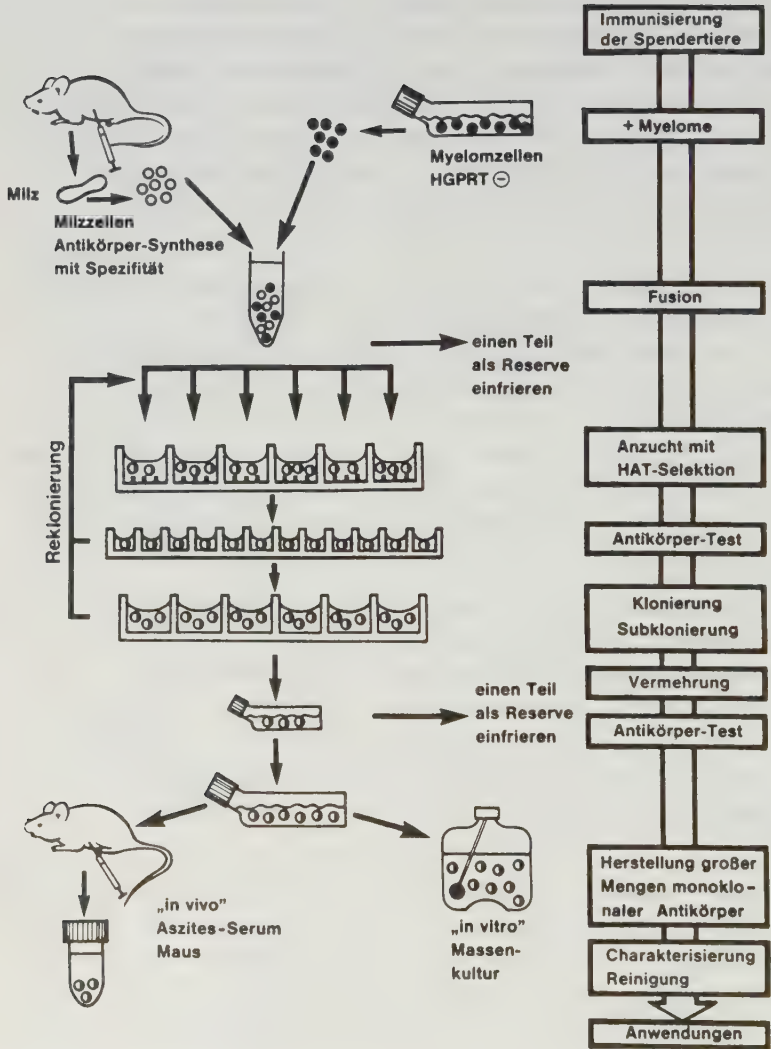


Abb. 15: Übersicht über die Gewinnung monoklonaler Antikörper (nach PETERS et al., 1985).

5. Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen Atropin

5.1. Darstellung des Atropin-BSA-Konjugates

Im Rahmen dieser Arbeit sollten monoklonale Antikörper gegen die Struktur des Alkaloids Hyoscyamin erzeugt werden. Für die Synthese des Immunogens wurde Atropin eingesetzt. Auf diese Weise konnte versucht werden, in einem Experiment spezifische Antikörper gegen die D- und die L-Form des Alkaloids zu gewinnen.

Die Verknüpfung von Hapten und Protein durch ein Propionsäuremolekül hatte bei der Entwicklung des Hyoscyamin-Radioimmuntests die besten Ergebnisse gebracht und wurde übernommen. Die Vorschriften zur Herstellung des Norhyoscyamin-N-propionsäure-Konjugats konnten unverändert auf Atropin angewendet werden. Die Demethylierung von Atropin (vgl. III.1.1.) lieferte Noratropin, charakterisiert durch ein Massenspektrum wie Norhyoscyamin, den Schmelzpunkt von 111°C ($113\text{--}114^{\circ}\text{C}$ nach PFISTER, 1978) und die fehlende optische Drehung. Nach der Reaktion mit Acrylsäure konnte das Produkt an Rindersealbumin gekoppelt werden (vgl. III.1.2.).

5.2. Verlauf der Immunantwort im Serum

Mit ihren Untersuchungen zum Einfluß der Immunisierung auf das Fusionsergebnis bestätigten STÄHLI et al. (1980) die Schlußfolgerung von SHULMAN et al. (1978). Eine längere Immunisierungsdauer führte zu einer höheren Ausbeute an antigenspezifischen Hybridomklonen. Darüber hinaus stimulieren mehrmalige Injektionen die sekundäre Immunantwort, die sich durch höhere Spezifität auszeichnet.

Ein einheitliches Immunisierungsschema läßt sich aus der Literatur allerdings nicht ableiten, da erfolgreiche Fusionen nach sehr unterschiedlichen Immunisierungsprotokollen verzeichnet wurden.

	Anzahl der Mäuse nach verschiedenen Dosen an Atropin-Konjugat		
	50 µg	100 µg	200 µg
nach 3 Immunisierungen			
keine Immunantwort $B_0 < 5 \%$	3	1	2
schwache Immunantwort	0	0	0
gute Immunantwort $B_0 > 20 \%$	0	2	1
nach 5 Immunisierungen			
keine Immunantwort	3	0	0
schwache Immunantwort	0	0	2
gute Immunantwort	0	a)	b)

Tab. 12: Unterschiedliche Immunantwort bei intramuskulärer Injektion verschiedener Mengen des Atropin-BSA-Konjugats

a) die Tiere erhielten statt der 5. Immunisierung einmal bzw. zweimal drei Booster-Injektionen und erreichten Bindungswerte von 22 und 55%

b) das Tier erhielt zweimal drei Booster-Injektionen nach der vierten Immunisierung und zeigte 55% Bindung

Für die ersten Versuche wurden je drei Mäuse mit 50 µg, 100 µg und 200 µg Atropin-Konjugat intramuskulär immunisiert, dazu drei Mäuse mit 200 µg Antigen intraperitoneal. Zwischen erster und zweiter Immunisierung lagen drei Wochen, weitere Injektionen folgten in zweiwöchigem Abstand. Tabelle 12 stellt die Ergebnisse der Bindungstests nach intramuskulärer Gabe des Antigens dar. Bei intraperitonealer Injektion zeigten die Tiere nach acht Wochen nur schwache Immunantworten, die nach einer weiteren Grundimmunisierung und zweimal drei Booster-Injektionen in den beiden letzten Wochen vor der Fusion auf Werte von 25 bis 55 Prozent anstiegen. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgten danach Immunisierungen

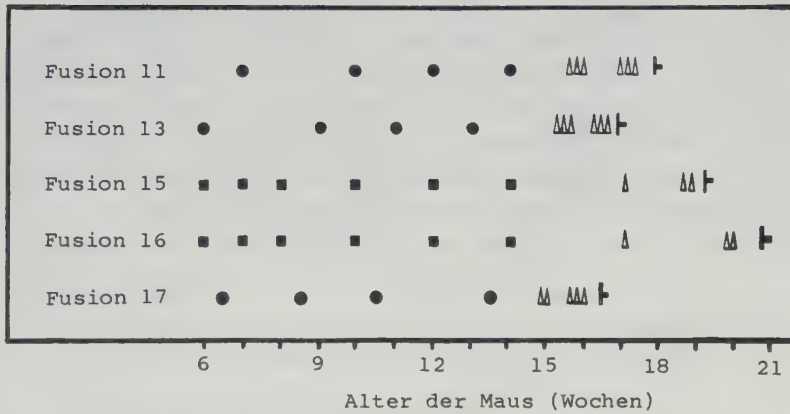


Abb. 16: Immunisierungsschemata der Fusionen, nach denen spezifische Antikörper gegen Atropin detektiert wurden.

- intramuskuläre Injektion mit CFA
- intraperitoneale Injektion mit CFA
- ▲ Booster-Injektion ohne CFA
- | Fusion

stets mit Antigendosen zwischen 100 und 180 μg . Außerdem wurden immer die insgesamt sechs Booster-Injektionen in den letzten zehn Tagen vor der Fusion verabreicht. Sowohl die Anzahl als auch der Abstand der Grundimmunisierungen wurde variiert, da das Einhalten des Schemas nicht immer zu befriedigenden Ergebnissen führte. Den Ablauf der Immunisierungen vor den erfolgreichen Fusionen zeigt die Abbildung 16.

5.3. Test der Zellkulturüberstände auf Antikörper der gewünschten Spezifität

Die Fusionsprodukte wurden im HAT+15-Selektionsmedium kultiviert. Da den verwendeten Myelomstämmen die Hypoxanthin-

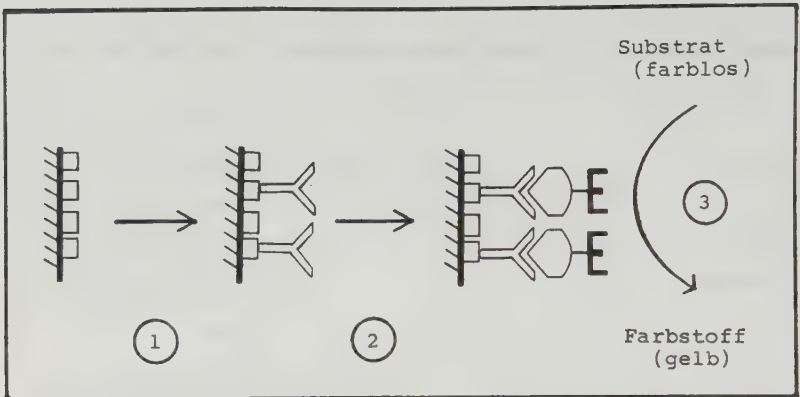


Abb. 17: Prinzip des Nachweises spezifischer Antikörper gegen Atropin

- ① Incubation mit Zellkulturüberstand
- ② Immunreaktion mit Atropin-AP-Konjugat
- ③ Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität durch photometrische Endpunktmessung



Antikörper



Atropin-AP-Konjugat



Kunststoffmaterial der Mikrotiterplatte, beschichtet mit Protein A

Guanin-Phosphoribosyl-Transferase fehlte, konnten sich ca. zehn Tage nach einer Fusion nur noch Hybridomzellen vermehren, bei denen dieser Gendefekt aufgehoben war (s. II.10.5.).

Unter der großen Zahl an Hybridomklonen nach einer geglückten Fusion mußten die diejenigen selektiert werden, die Antikörper der gewünschten Spezifität sekretieren. Das zu entwickelnde Testsystem sollte den Nachweis geringer Antikörpermengen und die Prüfung großer Probenzahlen in kurzer Zeit ermöglichen.

Ein bewährtes Verfahren zum Nachweis monoklonaler Antikörper gegen lösliche Antigene ist der Festphasen-Enzymimmuntest (LOEVBORG, 1982). Dabei werden die Näpfe einer Mikrotiterplatte mit dem Antigen beschichtet und anschließend mit dem Zellkulturüberstand inkubiert. Im nächsten Schritt werden enzymmarkierte Anti-Maus-Antikörper zugegeben. Kann nach einem weiteren Waschschrift die Enzymaktivität in den Näpfen nachgewiesen werden, enthielt der Zellkulturüberstand Antikörper gegen das wandgebundene Antigen.

Atropin bindet aber wie die meisten Haptene nicht an die Kunststoffoberflächen der Mikrotiterplatten. Deshalb wurde ein Testsystem aufgebaut, das die Abbildung 17 in seinen wesentlichen Schritten darstellt. Durchgeführt wurde der Nachweis wie folgt:

- Vorbereitung der Mikrotiterplatte gemäß II.12.1.
- Benetzen der Näpfe mit 0,05 ml Testpuffer III und Zupipettieren von 0,15 ml Zellkulturüberstand oder Kontrollösung. Inkubation bei 4°C über 15 Stunden.
- Dreimaliges Waschen der Näpfe durch Füllen mit PBS. Füllen mit 0,10 ml der Lösung des Noratropin-N-essigsäure-AP-Konjugats in Tris-Puffer pH 7,8, eingestellt auf eine Extinktion von 0,6 - 0,9 für die Kontrolle mit der 1:200 000-Verdünnung von 160A. Inkubation bei 4°C über vier Stunden.
- Waschen der Näpfe durch zweimaliges Füllen mit PBS und Nachspülen mit H₂O. Inkubation mit AP-Substrat bei 37°C über 4 Stunden und Messung der Extinktion bei 410 nm.

Die Beschichtung mit Protein A war notwendig, da sonst die unspezifische Bindungskapazität der Kunststoffoberflächen durch den hohen Proteingehalt des Mediums abgesättigt worden wäre, ohne daß sich genügend spezifische Antikörper angelagert hätten. Die Synthese des Atropin-AP-Konjugats ging aus von Noratropin (s. III.5.1.) und folgte der Vorschrift für Norhyoscyamin-N-essigsäure-AP-Konjugat (s. III.3.1.). Der Testpuffer III verhinderte durch die Erhöhung der Ionenstär-

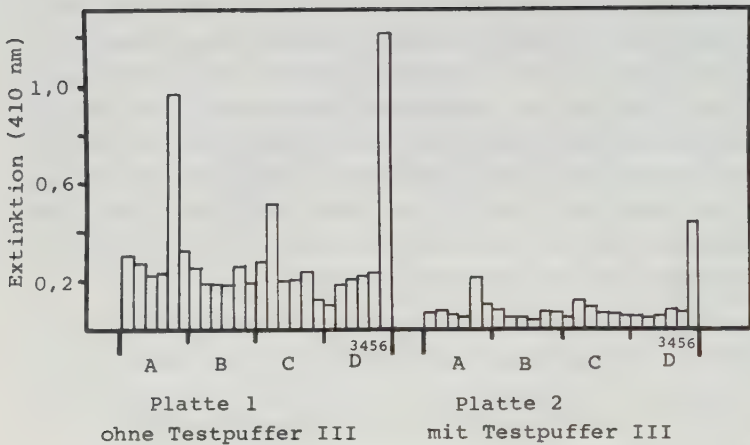


Abb. 18: ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen Atropin: Vergleich der Meßwerte mit und ohne Zusatz von Testpuffer III.

Kontrollen: 3=Milzzellen 4=Myelomzellen 5=Kulturmedium
6=Serum 160A, 1:300 000

ke und den Zusatz des Detergens das Auftreten falschpositiver Meßwerte. Abbildung 18 vergleicht die Ergebnisse für die gleichen Kulturüberstände in zwei unterschiedlich behandelten Testplatten. Unspezifische Bindung von Phosphatase täuschte das Vorliegen spezifischer Antikörper in Napf A5 vor, wenn ohne Zusatz von Testpuffer III vorgegangen wurde. Die Kontrollen im Test verhinderten dies nicht, da es sich um die Eigenheit eines Hybridomklones handelte.

Die Empfindlichkeit des Nachweises belegten die in Abbildung 19 gezeigten Ergebnisse. Schon für die 1:300 000-Verdünnung des Serums 160A wurde eine Extinktion gemessen, die den siebenfachen Wert der unspezifischen Bindung annahm. Diese

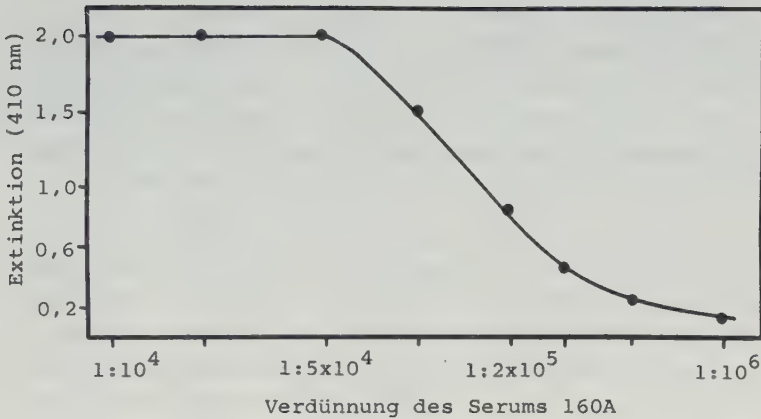


Abb. 19: Empfindlichkeit des Nachweises spezifischer Antikörper gegen Atropin im ELISA.
 Versuchsvorschrift s. III.5.3.
 Detektion mit Noratropin-N-essigsäure-AP-Konjugat.
 Maximalwert der Extinktion ($E = 2,0$) ist durch das Meßgerät bedingt.

Verdünnung bestimmte als Kontrollösung den Grenzwert für das Vorliegen der gesuchten Antikörper. Zusammen mit der leichten Durchführung des Tests, der die gleichzeitige Bearbeitung von über 1000 Proben erlaubte, waren damit die Anforderungen an ein Selektionssystem für monoklonale Antikörper erfüllt.

Als Gegenprobe zum Ausschluß falschpositiver Ergebnisse diente ein zweiter Test, bei dem die verwendete Verdünnung des Atropin-AP-Konjugats 10 mg/ml Atropinsulfat enthielt. Dies mußte jede Extinktionserhöhung verhindern, wenn sie im ersten Test aufgrund spezifischer Antikörper aufgetreten war.

5.4. Protokoll zur Durchführung der Fusion von Milz- und Myelomzellen

KÖHLER und MILSTEIN (1975) leiteten die Fusion der Zellen durch das Sendai-Virus ein. Später verwendeten und GEFTER et al. (1977) Polyethylenglykol zu diesem Zweck und fanden eine höhere Ausbeute an fusionierten Zellen. Diese Methode hat sich seither in der Hybridomatechnik durchgesetzt.

In der Literatur beschriebene Fusionsprotokolle weichen z.T. stark voneinander ab. Die Unterschiede liegen in den verwendeten Medien, der Temperatur während der Fusion, der benutzten PEG-Qualität und seiner Konzentration, der Zeitdauer verschiedener Schritte, den Kultivierungsbedingungen nach der Fusion und anderen Parametern. Im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München war eine Vorschrift eingeführt, die im wesentlichen der Methode von GALFRE und MILSTEIN (1981) entsprach (WALLSCHLÄGER, 1984). Die erreichten Ausbeuten von durchschnittlich 20 Klonen pro Fusion genügten, um spezifische Antikörper gegen die bearbeiteten Proteine zu erhalten (DORNREITER, 1985).

Diese Vorschrift wurde für die ersten sechs Fusionen übernommen. Sie unterschied sich in folgenden Punkten vom in II.10.4. beschriebenen Fusionsprotokoll: die Suspension der Milz- und Myelomzellen erfolgte vor der Fusion in Hanks Balanced Salt Solution (HANKS und WALLACE, 1949; Fa. Gibco) statt in RPMI, der CO_2 -Gehalt der Atmosphäre in den Begasungsbrutschränken lag bei 8% und das Einwirken der PEG-Lösung geschah nach einem anderen Plan. Die Gesamtmenge wurde innerhalb von 90 Sekunden zugetropft, 10 - 60 Sekunden einwirken lassen, mit 1 ml RPMI in 90 Sekunden und mit 20 ml während 5 Minuten verdünnt. Trotz guter Immunantwort der Tiere wurden nur wenige wachsende Klone beobachtet, von denen keiner Antikörper der gewünschten Spezifität lieferte (s. Tabelle 13).

Bei den Fusionen 7 - 9 wurde erstmals die Vorschrift von II.10.4. eingehalten. Die Fusionsprodukte wurden zur Hälfte

Nr. der Fusion	Myelom- stamm	Näpfe/ Fusion	bewachsene Näpfe	positive Klone
1	PAI	144	12	0
2	PAI	144	20	0
3	Sp2/0	144	4	0
4	PAI	96	8	0
5	Sp2/0	96	0	0
6	NS-1	96	1	0
7a	PAI	48	34	0
7b		48	34	0
8a	NS-1	48	44	0
8b		48	35	0
9a	X63	48	21	0
9b		48	15	0
10	NS-1	120	83	0
11	PAI/0	96	70	2
12	NS-1	77	66	0
13	PAI/0	96	78	2
14	NS-1	96	44	0
15	PAI/0	96	79	1
16c	PAI/0	48	47	2
16d		480	119	0
17c	PAI/0	48	48	1
17d		480	165	0

Tab. 13: Ergebnisse der Fusionen (weitere Erläuterungen werden im Text gegeben)

a,b: kultiviert bei 5 bzw. 7% CO₂

c,d: verteilt auf Kulturplatten²
mit 24 bzw. 96 Näpfen

bei 5%, der Rest bei 7% CO₂-Gehalt in den Brutschränken kultiviert. Die Ausbeute an wachsenden Klonen war deutlich erhöht gegenüber den ersten sechs Fusionen, und der höhere pH-Wert im Medium durch die geringere CO₂-Begasung erwies sich als günstiger. Diese Bedingungen wurden für die weitere Arbeit beibehalten.

Die Verwendung des Myelomstamms PAI/O in der Fusion 11 brachte Klonausbeuten wie NS-1 in den Fusionen 10 und 12 sowie die ersten positiven Klone.

Die Fusionshäufigkeit hatte sich mit einem Klon pro 10⁶ eingesetzte Zellen in dem von GODING (1983) angegebenen Bereich von 10⁵ bis 10⁷ Zellen stabilisiert. Dennoch schien eine Erhöhung der Ausbeute erstrebenswert. Für die Fusionen 13 und 15 wurde daher den Myelomzellen drei Stunden vor dem Abzentrifugieren Colcemid (Fa. Calbiochem, Frankfurt a.M.) in der Konzentration 50 ng/ml Medium zugesetzt (MIYAHARA et al., 1984). Die Klonausbeute lag relativ hoch, insbesondere im Vergleich zur Fusion 14. Die Kulturschalen der Fusionen 13 und 15 waren z.T. dicht bewachsen, sodaß auf das Vorliegen mehrerer Klone pro Napf geschlossen werden konnte.

Um die Ausbeute an einzelnen Klonen unter den optimierten Fusionsbedingungen abschätzen zu können, wurden die Fusionen 16 und 17 je zur Hälfte in zwei Kulturplatten mit 24 Näpfen und in fünf Kulturplatten mit 96 Näpfen angezogen. Aus der Zahl der bewachsenen Näpfe in den zuletzt genannten Platten berechnete sich eine Ausbeute von 240 bzw. 330 Hybridomzellstämmen pro Fusion.

Die Fusionsausbeute konnte also gegenüber dem ursprünglichen Fusionsprotokoll um den Faktor 15 verbessert werden. Diese Ergebnisse traten reproduzierbar auf und schlossen den Verdacht aus, es handle sich um zufällige Schwankungen. Unter den Hybridomklonen wurden durch das Testsystem gemäß III.5.3. sieben Zellstämme selektiert, die Antikörper gegen Atropin bildeten. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis des Nach-

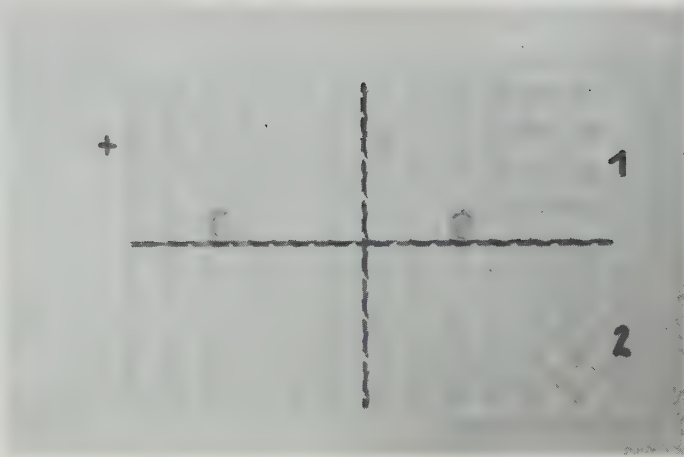


Abb. 20: Nachweis spezifischer Antikörper gegen Atropin in der Fusion 15 an zwölf Tage alten Hybridomklonen: Aussehen der Mikrotiterplatte nach der Inkubation bei 37°C. Versuchsvorschrift s. III.5.3.

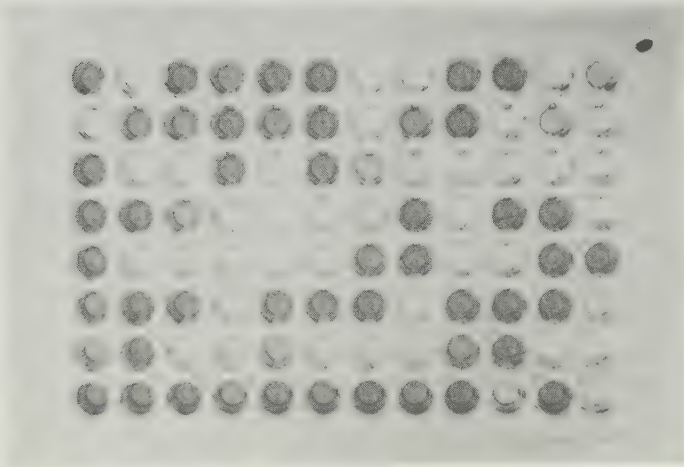


Abb. 21: Nachweis spezifischer Antikörper gegen Atropin in der zweiten Klonierung von ATR15-1D3: Aussehen der Mikrotiterplatte nach der Incubation bei 37°C.

weises 12 Tage nach einer Fusion, für Abbildung 21 wurde die zweite Klonierung der Zellen aus dem positiven Napf getestet (s. II.10.5.). Hier konnten in den Überständen aller bewachsenen Nöpfe Antikörper nachgewiesen werden.

5.5. Eigenschaften der gewonnenen Antikörper

5.5.1. Bestimmung der Immunglobulinklassen

Monoklonale Antikörper gehören stets einer ganz bestimmten Antikörper(sub)klasse an. Ihre Kenntnis ist für die Auswahl bekannter Reinigungsmethoden für Immunglobuline entsprechend der Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers von Bedeutung (SCHULTZE und HEREMANS, 1966; PARHAM, 1983).

Für die Bestimmung nach II.10.7. wurden Überstände dicht bewachsener Hybridomkulturen verwendet. Die Abbildung 22 zeigt den Test für eine Zelllinie, Tabelle 14 faßt die Ergebnisse zusammen. Alle Antikörper gehörten einer der IgG-Klassen an, was wegen der wiederholten Immunisierungen der Spendertiere nicht überraschte.

Zelllinie	ATR11-8A4	ATR11-9A2	ATR13-2B1	ATR15-1D3
Ig-Klasse	Ig G1	Ig G1	Ig G1	Ig G3

Zelllinie	ATR16-2D3	ATR16-2A5	ATR17-1C6
Ig-Klasse	Ig G2b	Ig G2b	Ig G1

Tab. 14: Die Immunglobulinklassen der verschiedenen anti-Atropin Maus-Antikörper.
Bestimmung nach II.10.7. mittels subklassenspezifischer Rabbit-anti-Mouse-Antikörper an Zellkulturüberständen der einzelnen Hybridomstämme.



Abb. 22: Bestimmung der Immunglobulinsubklasse der Antikörper von ATR15-1D3 mit subklassenspezifischen Rabbit-anti-Maus-Antikörpern.

Spalte	2	3	4	5	6	7	8	9	10 - 12
RAM gegen	GMADE	Fab	G1	G2a	G2b	G3	A	M	alle Ig-
Ig-Klasse									Klassen
Ergebnis	+	+	-	-	-	+	-	-	++ +

Beschreibung des Testsystems s. II.10.7.

Die Detektion der gebundenen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand von ATR15-1D3 in Zeile C und D erfolgte mit dem Konjugat von Rabbit-anti-Maus-Antikörpern gegen Immunglobuline, gekoppelt an alkalische Phosphatase; in Spalte 12 mit Goat-anti-Maus-Antikörpern gegen IgG, gekoppelt an Peroxidase.

Kontrollversuche:

Zeile B: frisches HT+10-Medium statt der Zellkulturüberstände von ATR15-1D3.

Zeile E: ohne RAM-AP-Konjugat, dafür PBS.

Zeile F: ohne subklassenspezifische Antikörper.

5.5.2. Vergleich der Affinitäten

Die Affinität eines Antikörpers wird durch das Gleichgewicht zwischen Antikörperbindungsstellen und freiem Antigen sowie gebundenem Antigen beschrieben. Für den Test nach III.5.3. konnte angenommen werden, daß aus jedem Zellkulturüberstand etwa die gleiche Antikörpermenge an Protein A gebunden wird. Die gebundene Enzymaktivität war damit direkt abhängig von der Affinität der Antikörper zum Antigen. Die Tabelle 15 zeigt das Ergebnis des Versuchs, für den die Überstände dicht bewachsener Zellkulturen der vorhandenen Zelllinien eingesetzt wurden. Die Messung der Extinktionen zu Beginn der Inkubation bei 37°C und nach verschiedenen Zeiten erlaubte die Berechnung der gebundenen Enzymaktivität. Die Antikörper der Linie ATR15-1D3 besaßen die weitaus höchste Affinität und wurden daher für weitere Untersuchungen herangezogen. Die übrigen Antikörper waren wegen der geringen gebun-

Zelllinie	ATR11-8A4	ATR11-9A2	ATR13-2B1	ATR15-1D3
gebundene Enzymaktivität	20 pkat = 0,01 %	85 pkat = 0,038 %	0,13 nkat = 0,057 %	45 nkat = 20 %

Zelllinie	ATR16-2D3	ATR16-2A5	ATR17-1C6
gebundene Enzymaktivität	0,17 nkat = 0,076 %	0,13 nkat = 0,057 %	0,70 nkat = 0,31 %

Tab. 15: Vergleich der Bindungsstärke der verschiedenen anti-Atropin Maus-Antikörper anhand der gebundenen Enzymaktivität im ELISA nach III.5.3. Die Prozentangaben beziehen sich auf die eingesetzte Enzymaktivität an Noratropin-N-essigsäure-AP-Konjugat von 225 nkat pro Napf.

denen Enzymaktivität für die Entwicklung eines ELISA-Verfahrens zur Bestimmung von Atropin nicht geeignet.

Die Bindungsstärken gegenüber ^3H -Hyoscyamin wurden nicht bestimmt, da die Zellkulturüberstände im Radioimmuntest (s. II.11.) keine Bindung zeigten und selbst die unverdünnte Ascitesflüssigkeit der Zelllinie ATR15-1D3 in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen weniger als 1% des eingesetzten ^3H -Hyoscyamins gebunden hatte.

5.5.3. Bestimmung der Antikörpertiter nach in vitro- und in vivo-Kultivierung der Hybridomzellen

Monoklonale Antikörper können durch in vitro-Massenkultur der Hybridomzellen hergestellt werden. Sie sind dann frei von Verunreinigungen durch andere Immunglobuline und enthalten wenig, bei Verwendung serumfreien Mediums kein fremdes Protein. Ein Versuch zeigte den Verlauf der Antikörperproduktion in HAT+10-Medium und serumfreien Medium FEB 100 (Fa. Biochrom, Berlin). Je zwei Kulturflaschen mit 15 ml Medium wurden mit 3×10^6 Zellen der Linie ATR15-1D3 angeimpft. Die entnommenen Medienproben wurden in 1:150-Verdünnung auf ihren Antikörpergehalt untersucht. Die Abbildung 23 zeigt die Abhängigkeit der Antikörperkonzentration von der Kulturdauer. Das Ergebnis bestätigte den mikroskopischen Befund, daß die Zellen ab dem vierten Tag abzusterben begannen.

Die Zelllinie ATR15-1D3 eignete sich auch zur in vivo-Produktion von Antikörpern nach II.10.6.2. Nach Bestimmung des Antikörpergehalts verschiedener Verdünnungen von Ascitesflüssigkeit und Zellkulturmedium wurden in Abbildung 24 die Ergebnisse verglichen. Der höheren Konzentration nach in vivo-Produktion stand die höhere Reinheit im Zellkulturmedium gegenüber. Hier wurden die pro Napf verfügbaren Bindungsstellen des Protein A ausschließlich durch anti-Atropin-Maus-Antikörper genutzt.

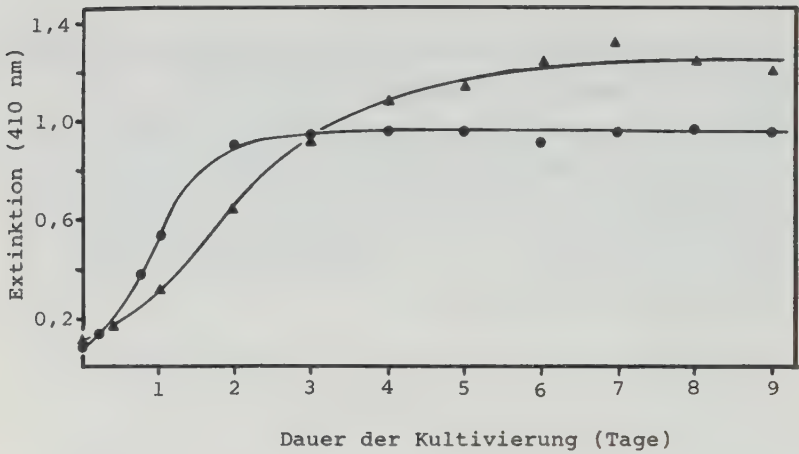


Abb. 23: Antikörper im Zellkulturüberstand von ATR15-1D3 bei Verwendung von HAT+10-Medium (●) und serumfreien FEB 100-Medium (▲). Nachweis der Antikörper nach III.5.3., weitere Angaben im Text.

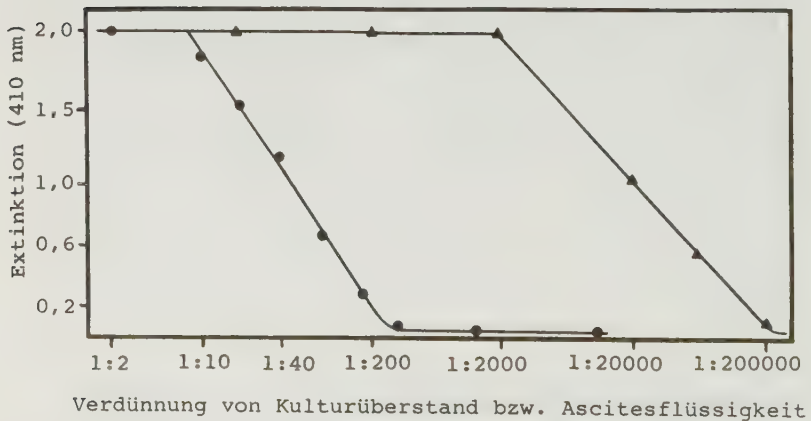


Abb. 24: Antikörperproduktion durch den Hybridomstamm ATR15-1D3 nach *in vivo*- (▲) und *in vitro*- (●) Kultivierung. Nachweis der Antikörper nach III.5.3. Maximalwert der Extinktion ($E = 2,0$) durch das Meßgerät bedingt.

5.6. Verwendung der monoklonalen Antikörper im Enzymimmuntest für Hyoscyamin

5.6.1. Wahl geeigneter Testbedingungen

Der prinzipielle Ablauf des Enzymimmuntests wurde in II.12.2. beschrieben. Da monoklonale Antikörper schlecht an die Kunststoffoberfläche binden (HAAIJMAN et al., 1984), wurden gemäß II.12.1. mit Protein A beschichtete Mikrotiterplatten für den Test verwendet.

Nach III.3.2. waren geeignete Verdünnungen der Hyoscyamin-AP-Konjugate bekannt. Es erfolgte ein Bindungstest unter Verwendung dieser Konzentrationen an Norhyoscyamin-N- β -propiionsäure-AP und Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP mit verschiedenen Verdünnungen eines Zellkulturüberstandes der Linie ATR15-1D3. Die Verdünnung 1:66 in Tris-Puffer pH 7,8, dem 22 mg/ml NaCl und 0,025% Tween 80 zugesetzt waren, ergab in beiden Fällen die gewünschte Extinktion um den Wert 0,9. Für alle weiteren Versuchen erfolgte die Beschichtung der vorbehandelten Platten mit dieser Verdünnung bei 4°C über 15 Stunden.

Die Testpuffer I und II konnten vom Scopolamin-Enzymimmuntest übernommen werden (s. III.2.4.). Geändert wurde gegenüber dem Schema von II.12.2. die Inkubation bei 4°C. Nach dem Pipettieren der Standard- und Probelösungen wurde 90 min inkubiert, erst dann die Enzymtracerlösung zupipettiert. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde dann nochmals dreieinhalb Stunden bei 4°C inkubiert.

5.6.2. Standardisierung des Tests

Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Standardkurven zeigt die Abbildung 25. Wichtige Parameter des Testsystems mit Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP sind in Tabelle 17 zu finden.

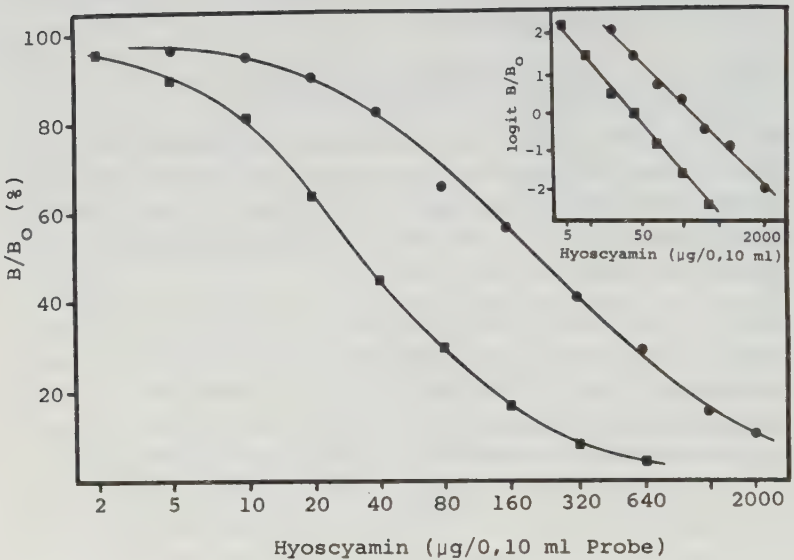


Abb. 25: Standardkurven im Hyoscyamin-Enzymimmunttest unter Verwendung monoklonaler Antikörper.

● Norhyoscyamin-N- β -propionsäure-AP

■ Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP

5.6.3. Kreuzreaktionen

Diese Untersuchungen zur Spezifität des Testsystems erfolgten wie bei den übrigen immunologischen Bestimmungsverfahren. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 16 zusammengefaßt. Der Antikörper scheint ausschließlich gegen den Alkaminteil der Alkaloide gerichtet zu sein, da er D- und L-Hyoscyamin gleich erfaßt und auch Tropin bindet. Abweichungen in diesem Molekülteil wie bei Scopolamin und 6 β -Hydroxihyoscyamin verringern die Bindungsfähigkeit stark. Nicht erklärt werden konnte die hohe Kreuzreaktivität von Dehydrohyoscyamin und

Apoatropin. Der hohe Wert für Norhyoscyamin könnte von der geringfügigen Verunreinigung durch Norapoatropin in dieser Referenzsubstanz herrühren, die stets nachzuweisen war.

Substanz	Kreuzreaktionen bei Verwendung von	
	Tracer 1	Tracer 3
L-Hyoscyamin	100	100
Atropin	102	103
D-Hyoscyamin	99	102
Scopolamin	4,1	2,3
Dehydrohyoscyamin	238	245
6 β -Hydroxyhyoscyamin	11	8,3
Norhyoscyamin	180	195
Apoatropin	460	670
Meteloidin	3,4	2,0
Dihydroxilittorin	3,9	2,4
Tropin	50	40
Tropasäure	0	0

Tab. 16: Tropanalkaloide und ihre Kreuzreaktionen im Hyoscyamin-Enzymimmunttest unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, ausgedrückt in Prozent auf molarer Basis.

Tracer 1: Norhyoscyamin-N- β -propionsäure-AP

Tracer 3: Hyoscyamin-O-bernsteinsäure-AP

5.6.4. Vergleich mit anderen Immuntests für Hyoscyamin

Die Tabelle 17 stellt einander die wichtigsten Parameter der neuentwickelten Verfahren zur Bestimmung von Hyoscyamin gegenüber. Die Verwendung monoklonaler Antikörper im Enzymimmuntest führte zu einer deutlich steileren Standardkurve und erhöhte damit die Präzision des Testsystems. Wegen seiner hohen Empfindlichkeit und Spezifität blieb für die Messung von Hyoscyamin in ungereinigten Pflanzenextrakten aber der Radioimmuntest die Methode der Wahl.

Bestimmung von Hyoscyamin durch
RIA ELISA

Antikörper	Serum 188A (polyklonal)	Serum 188A (polyklonal)	ATR15-1D3 (monoklonal)
markiertes Antigen	³ H-Hyos- cyamin	Hyoscyamin-O-bernstein- säure-AP-Konjugat	
Meßbereich	0,10-20 ng	0,4-1000 µg	5,0-640 µg
Nachweisgrenze	30 pg	0,2 µg	3,5 µg
B/B ₀ = 50%	0,11 ng	8,0 µg	32 µg
UB - Wert	2,0%	0,06	0,08
Steigung der logit-Geraden	- 2,26	- 1,15	- 2,53

Tab. 17: Charakterisierung der Standardkurven in den immunologischen Bestimmungsverfahren für Hyoscyamin.

6. Untersuchungen zum Vorkommen der Tropasäureester in differenzierten Pflanzen

6.1. Tropasäureester in Herbarmaterial von Solanaceen-Arten

Die systematische Gliederung des Pflanzenreichs erfolgte traditionell aufgrund morphologischer und cytologischer Merkmale. Neuere Untersuchungen berücksichtigen in immer stärkerem Maß auch die Inhaltsstoffe der Pflanzen, insbesondere die Alkaloide (HEGNAUER, 1958). Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen entsprechender Untersuchungsergebnisse von verschiedenen Pflanzen, die wegen ihrer Herkunft aus aller Welt nicht in großen Mengen oder gar als frisches Pflanzenmaterial zur Verfügung stehen. Erstmals benutzten deshalb WEILER et al. (1980) einen Radioimmuntest zur Untersuchung herbarisierter Pflanzen. Sie untersuchten 250 Solanum-Arten auf ihren Gehalt an dem Alkaloid Solasodin.

Alkaloide mit dem Tropangerüst als gemeinsamem Strukturmerkmal sind in den Pflanzenfamilien der Convulvaceen, Cruciferae, Dioscoreaceae, Elacocarpaceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Proteaceae, Rhizophoraceae und Solanaceae bekannt geworden. Die klassischen Tropanalkaloide, d.h. die Ester der Tropasäure mit Derivaten des Tropans, wurden bei den Solanaceen gefunden. Ihr Vorkommen wurde für die Gattungen Anthocercis, Anthotroche, Atropa, Atropanthe, Datura, Duboisia, Hyoscyamus, Latua, Mandragora, Methysticodendron, Physochlaina, Przewalskia, Salpichroa, Scopolia und Solandra berichtet (ROMEIKE, 1978; EVANS, 1979).

Herbarmaterial von verschiedenen Arten dieser Gattungen wurde mit Radio- und Enzymimmuntest auf seinen Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin untersucht (vgl. II.1.). Die Tabelle 18 faßt die Ergebnisse zusammen. Die Bezeichnung der Pflanzen folgte den aktuellen Angaben auf den Herbarbögen.

Unter den Bedingungen dieser Untersuchung betrugen die Nachweisgrenzen $9 \times 10^{-5}\%$ Hyoscyamin und $2 \times 10^{-5}\%$ Scopolamin. Diese Angaben wurden auf das Trockengewicht bezogen und für

eine durchschnittliche Probe mit 4 mg Einwaage berechnet.

Die Tabelle zeigt, daß die Tropanalkaloide noch in Proben nachzuweisen waren, die vor über 200 Jahren gesammelt wurden. Nach so langer Zeit wird der gemessene Wert nicht mehr den Gehalt in der ursprünglichen Pflanze wiedergeben. Der Enzymimmuntest konnte aber wie der Radioimmuntest nützliche Grundlagen für die chemotaxonomische Einstufung der Pflanzen liefern. Dabei muß kaum auf das Alter der Proben geachtet werden. Zu fordern ist dagegen die Untersuchung verschiedener Pflanzen einer Art von unterschiedlichen Standorten. Die Gehalte an einem Alkaloid können innerhalb einer Art recht stark schwanken (vgl. die Ergebnisse bei Hyoscyamus niger und Datura stramonium). Dies könnte bei einer einzelnen Probe zu einem falschen, negativen Ergebnis für einen Inhaltsstoff führen.

Insgesamt wurden 241 Herbarproben von 85 Arten aus den oben genannten Gattungen der Solanaceen untersucht. Bei allen Pflanzen der Genera Anthocercis, Anthotroche, Atropa, Datura, Duboisia, Hyoscyamus, Latua, Mandragora, Methysticodendron, Physochlaina, Przewalskia, Scopolia und Solandra wurden die Alkaloide Hyoscyamin oder Scopolamin nachgewiesen, bei fast alle Pflanzen beide Substanzen. Die Ausnahmen traten bei einigen Proben auf, wo ein sehr hoher Gehalt eines Alkaloids aufgrund der Kreuzreaktivitäten die Nachweisempfindlichkeit im anderen Nachweissystem verringerte. So lag bei Datura sanguinea der Scopolamingehalt sehr hoch,

Tab. 18: Hyoscyamin- und Scopolamingehalt von Blattproben herbarisierter Pflanzen aus der Familie der Solanaceen

BT: Pflanze stammt aus einem Botanischen Garten,
nicht vom natürlichen Standort

M : Herbarbogen im Staatsherbar München

H : Herbarbogen in den Harvard University Herbaria
Die Angabe des Alkaloidgehalts 0 bedeutet, daß der Gehalt unter der angegebenen Nachweisgrenze lag.

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG) Hyosc. Scop.	
<u>Gattung Anthocercis</u>				
A. albicans Lungh.	Australien	1899 (M)	1,2	24
A. anisantha Endl.	Australien	1958 (M)	432	263
	Australien	1905 (M)	82	50
A. eadesii F.v.M.	Australien	1930 (M)	30	21
A. ilicifolia Hook.	Australien	1982 (M)	108	15
A. littoria Labill.	Australien	1982 (M)	2,1	0,13
	Australien	1933 (M)	2,8	1,1
	Australien	1905 (M)	18	10
A. microphylla F.Mueller	Australien	1905 (M)	0,31	0,031
A. myosotidea F.v.M.	Australien	1958 (M)	25	125
	Australien	1928 (M)	33	127
A. scabrella Bth.	Australien	1897 (M)	1,3	16
A. tasmanica Hook.	Tasmanien	1872 (M)	1,9	41
	Tasmanien	? (M)	1,5	19
A. viscosa Br.	Australien	1928 (M)	49	3,1
	Australien	? (M)	63	2,0
	Berlin (BT)	1831 (M)	160	2,8
<u>Gattung Anthotroche</u>				
A. pannosa	Australien	1901 (M)	6	2,8
<u>Gattung Atropa</u>				
A. acuminata Royle ex M.	Pakistan	1965 (M)	257	6,2
	Pakistan	1971 (M)	609	99
	Indien	1962 (M)	266	17
A. baetica Willk.	Spanien	1979 (M)	539	84
	Spanien	1968 (M)	1470	86
A. belladonna L.	Bayern	1972 (M)	562	97
	Hessen	1971 (M)	537	25
	Frankreich	1977 (M)	8,1	0,40
	Rumänien	1968 (M)	78	4,5
	Türkei	1891 (M)	408	77

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.

<i>A. caucasica</i> Kreyer	Kaukasus	1979 (M)	688	160
<i>A. komarovii</i> Blin.+Schal.	Rußland	1974 (M)	7,2	0,9
<i>A. lutescens</i> Jaqu.	Pakistan	? (M)	257	18

Gattung *Datura*

<i>D. alba</i> N.ab E.	Indien	?	129	794
	Indien	1836 (M)	15	30
	Indien	1836/40 (M)	133	20
<i>D. arborea</i> L.	Kolumbien	? (M)	1,1	7,9
	Chile	1860 (M)	40	136
<i>D. aurea</i> Lagerheim	Venezuela	1968 (M)	50	982
<i>D. candida</i> (Persoon) Saf-ford	München (BT)	1977 (M)	1,3	6,9
	Panama	1972 (M)	3,3	24
	Hawaii	1965 (M)	132	16
	Peru	? (M)	79	1770
	Mexiko	1897 (M)	5,8	50
<i>D. ceratocaula</i> Orteg.	Mexiko	1892 (M)	5,3	14
	Mexiko	1833 (M)	690	61
	München (BT)	1860 (M)	298	48
<i>D. fastuosa</i> L.	Venezuela	1920 (M)	994	865
	Brasilien	1913 (M)	3,8	92
	Brasilien	? (M)	30	92
	Indien	1902 (M)	75	132
<i>D. ferox</i> L.	Südwestafrika	1966(M)	48	55
	Südwestafrika	1963(M)	32	71
	Rhodesien	1960 (M)	34	400
	Uruguay	1925 (M)	12	292
<i>D. innoxia</i> Miller	Sizilien	1974 (M)	4,4	224
	Sizilien	1901 (M)	9,8	198
	Gran Canaria	1967 (M)	242	280
	Südwestafrika	1973(M)	18	105
	Südwestafrika	1965(M)	18	145
	Afghanistan	1969 (M)	4,3	21

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
	Pakistan	1970 (M)	30	90
	Missouri/USA	1955 (M)	95	612
	Mexiko	1901 (M)	29	182
	Puerto Rico	1885 (M)	18	86
<i>D. leichhardtii</i> F.v.M.	Australien	1900 (M)	72	132
<i>D. metel</i> L.	Thailand	1901 (M)	203	412
<i>D. meteloides</i> Dl.	Kalifornien	1937 (M)	115	217
	Kalifornien	1930 (M)	17	175
	Kalifornien	1916 (M)	84	1120
	Kalifornien	1865 (M)	23	425
<i>D. pruinosa</i> Greenm.n.sp.	Mexiko	1897 (M)	34	299
<i>D. quercifolia</i> H.+B.	Mexiko	1885 (M)	10	42
	München (BT)	1840 (M)	279	218
<i>D. sanguinea</i> (R.+P.) D.	Ecuador	1858 (M)	20	843
Don.	Bolivien	1897 (M)	44	1740
<i>D. stramonium</i> L.	Bayern	1983 (M)	536	106
	Bayern	1982 (M)	403	315
	Bayern	1981 (M)	369	103
	Bayern	1971 (M)	47	330
	Bayern	1963 (M)	15	42
	Bayern	1953 (M)	484	282
	Bayern	1954 (M)	287	153
	Bayern	1937 (M)	313	91
	Südtirol	1963 (M)	73	101
	Kalifornien	1935 (M)	56	558
	Südwestafrika	1975(M)	280	309
	Zimbabwe	1976 (M)	332	277
	Mozambique	1973 (M)	52	17
	Teneriffa	1970 (M)	20	28
	Pakistan	1971 (M)	104	237
	Afghanistan	1970 (M)	62	154
	Türkei	1891 (M)	112	121
	Nepal	1954 (M)	401	178
	Australien	1933 (M)	42	62

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
D. stramonium, var. tatula	Jugoslawien	1982 (M)	339	457
	Rumänien	1961 (M)	49	257
	Massachusetts	1975(M)	500	204
D. suaveolens (H.+B. ex Willd.)Bercht.+Pres.	Venezuela	1934 (M)	2,1	23
	Brasilien	? (M)	108	176
	Florida (BT)	1954 (M)	17	273
	Kalkutta (BT)	? (M)	5,9	15
<u>Gattung Duboisia</u>				
D. hopwoodii F.Muell.	Australien	1982 (M)	0,32	0,46
	Australien	1933 (M)	0,40	0,81
	Australien	1928 (M)	0,34	0,23
D. myoporoides R.Br.	Australien	1930 (M)	20	523
	Australien	1929 (M)	763	447
	Sydney (BT)	1899 (M)	820	90
<u>Gattung Hyoscyamus</u>				
H. afghanicus Poj.	Afghanistan	1969 (M)	1,8	0,30
	Afghanistan	1965 (M)	12	9,7
	Afghanistan	1965 (M)	6,9	2,0
H. albus L.	Spanien	1977 (M)	109	199
	Sizilien	1952 (M)	82	46
	Frankreich	1951 (M)	42	3,6
	Jugoslawien	1966 (M)	1,1	4,1
	Tunesien	1968 (M)	19	11
	Algerien	1954 (M)	6,0	23
	München (BT)	1948 (M)	0,46	3,5
	Iran(1900m)	1971 (M)	0,28	0,73
H. arachnoides Poj.	Iran(1300m)	1971 (M)	0,36	0,16
	Kurdistan	1957 (M)	0,91	0,25
H. aureus L.	Rhodos	1964 (M)	0,71	3,1
	Türkei	1966 (M)	14	69
	Israel	1982 (M)	1,0	25

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
	Jordanien	1976 (M)	0,76	0,34
	Syrien	1965 (M)	10	12
	Iran	1957 (M)	1,4	12
<i>H. bipinnatisectus</i>	Persien	1845 (M)	28	95
Boiss.n.sp.	Persien	1868 (M)	974	458
<i>H. camerarii</i> Fisch et Mey	?	? (M)	29	4,0
<i>H. cylindrocalyx</i> Rech.f.	Irak	1956/57 (M)	300	302
<i>H. frutillus</i> L.	Iran	1972 (M)	1,6	0,29
<i>H. insanus</i> Stocks	Pakistan	1956 (M)	710	296
	Pakistan	1903 (M)	1220	152
	Afghanistan	1977 (M)	1,7	2,1
	Afghanistan	1970 (M)	134	15
	Afghanistan	1971 (M)	4,6	1,1
<i>H. kopetdaghi</i> Poj.	Sowjetunion	1974 (M)	1,0	2,5
<i>H. kotschyanus</i> Poj.	Iran	1976 (M)	7,3	5,4
<i>H. kurdicus</i> Bornm.	Iran	1972 (M)	0,54	1,4
<i>H. leptocalyx</i> Stapf	Türkei	1957 (M)	0,31	0,15
<i>H. leucanthera</i> Bornm. et Gauba	Afghanistan	1970 (M)	171	41
	Iran	1971 (M)	113	13
	Iran	1948 (M)	69	70
<i>H. malekianus</i> Parsa	Iran	1977 (M)	17	230
<i>H. muticus</i> L.	Ägypten	1978 (M)	68	6,3
	Libyen	1970 (M)	57	3,4
	Afghanistan	? (M)	630	17
	Iran	1948 (M)	304	2,0
<i>H. muticus</i> ssp. <i>falezles</i>	Algerien	1982 (M)	385	15
(Cosson) Maire	Algerien	1982 (M)	1290	88
<i>H. niger</i> L.	Bayern	1977 (M)	0,66	0,25
	Bayern	1960 (M)	0,48	0,25
	Bayern	1965 (M)	3,5	3,3
	Bayern	1962 (M)	4,9	2,8
	Bayern	1973 (M)	0,48	0,46

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
	Bayern	1936 (M)	1,8	1,6
	Hessen	1900 (M)	0,21	2,5
	Moskau	1972 (M)	0,77	1,5
	Steiermark	1975 (M)	1,9	35
	Bornholm	1970 (M)	2,2	11
	Finnland	1916 (M)	1,3	0,23
	Türkei	1947 (M)	0,29	0,49
	Pakistan	1965 (M)	0,39	4,8
	Afghanistan	1971 (M)	0,25	1,3
<i>H. nutans</i> Sch.-Tem.	Iran	1977 (M)	171	19
<i>H. orthocarpus</i> Sch.-Tem.	Iran	1972 (M)	2780	0
<i>H. pulsillus</i> L.	Jordanien	1945 (M)	0,91	3,9
	Iran	1956 (M)	0,43	0,87
	Afghanistan	1977 (M)	0,32	0,87
	Ägypten	1835 (M)	2,8	7,1
	Sinai	1835 (M)	0,98	0,57
<i>H. reticulatus</i> L.	Iran	1976 (M)	0,061	0,40
	Israel	1952 (M)	0,33	3,9
	Syrien	1965 (M)	0,21	0,63
	Türkei	1891 (M)	0,10	0,19
<i>H. senecionis</i> Willd.	Afghanistan	1970 (M)	344	194
<i>H. senecionis</i> var. <i>bipinnatisectus</i>	Iran	1977 (M)	362	106
<i>H. squarrosus</i> Griff.	Afghanistan	1977 (M)	7,4	6,0
	Iran	1977 (M)	0,80	0,80
	Iran	1948 (M)	0,35	3,4
<i>H. tibesticus</i> Maire	Jordanien	1954 (M)	96	55

Gattung *Latua*

<i>L. pubiflora</i> Baillon	Chile	1969 (M)	5,3	3,8
	Chile	1969 (M)	84	27
	Chile	1969 (M)	308	110
	Chile	1969 (M)	539	213
<i>L. venenosa</i> Phil.	Chile	1931 (M)	896	49

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG) Hyosc. Scop.	
<u>Gattung Mandragora</u>				
M. autumnalis Bertol.	Spanien	1972 (M)	6,8	8,7
	Griechenland	1974 (M)	2,4	0,68
	Sizilien	1961 (M)	0,69	1,8
	Kreta	1954 (M)	1,3	1,8
	Marokko	1935 (M)	4,4	1,7
M. officinarum L.	Rhodos	1944 (M)	0,65	0,089
	Athen	? (M)	0,35	6,2
	Palestina	? (M)	7,1	3,9

Gattung Methysticodendron

M. amesianum R.E.Schultes	Kolumbien	1953 (H)	0,09	6,3
---------------------------	-----------	----------	------	-----

Gattung Physochlaina

P. orientalis (Bieb.) G.Don.	Türkei	1912 (M)	17	32
	Türkei	1894 (M)	273	572
	Kaukasus	1899 (M)	149	60
	München (BT)	1849 (M)	217	73
P. physaloides Dunal.	Russland	1772 (M)	4,5	10
	Sibirien	? (M)	4,8	32
	Leningrad (BT)	? (M)	0,22	0,17

Gattung Przewalskia

P. tangutica Maxim.	Tibet	1911 (M)	986	2400
---------------------	-------	----------	-----	------

Gattung Salpichroa

S. diffusa Miers	Ecuador	1952 (M)	0	0
	Ecuador	1952 (M)	0	0
S. organifolia (Lam.) Baillon	Frankreich	1971 (M)	0	0
	Algerien	1954 (M)	0	0
= S. rhomboidea (Gill. et Hook.)Miers	Uruguay	1927 (M)	0	0
	Uruguay	1903 (M)	0	0
	Argentinien	1950 (M)	0	0
	Argentinien	1874 (M)	0	0
	Kalifornien	1940 (M)	0	0

Art	Herkunft, Jahr der Herbarisierung und Herbar	Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
		Hyosc.	Scop.

Gattung Scopolia

<i>S. carniolica</i> Jaqu.	Jugoslawien	1974 (M)	5,3	20
	Rumänien	1967 (M)	0,16	0,13
	Polen	1967 (M)	169	93
	München (BT)	1940 (M)	6,3	11
<i>S. carniolica</i> var. <i>brevifolia</i> Dun.ap.DC.	Jugoslawien	1968 (M)	0,4	1,0
<i>S. caulescens</i> Diels	China	? (M)	661	0
<i>S. humilis</i> Hook.f.n.TH.	Sikkim	? (M)	66	11
<i>S. japonica</i> Maxim.	Japan	1963 (M)	8,5	24
	Japan	1969 (M)	121	23
<i>S. lurida</i> Dunal.	Nepal	1950 (M)	6,3	3,8
	München (BT)	1977 (M)	638	137
	München (BT)	1945 (M)	416	39
	Frankreich(BT)	1928(M)	625	101
<i>S. praeatta</i> Don.	Tibet	? (M)	1410	37
<i>S. sinensis</i> Hemsley	München (BT)	1934 (M)	162	258
<i>S. tangutica</i>	China	1914 (M)	31	220

Gattung Solandra

<i>S. grandiflora</i> Sw.	Jamaica	1816 (M)	1,2	0,2
	Puerto Rico	1886 (M)	28	6,2
	Mexiko	1866 (M)	77	1,5
<i>S. guttata</i> Don.	Mexiko	1954 (M)	55	1290
	Venezuela	1939 (M)	1,3	1,2
	Hawaii	1937 (M)	2,0	0,2
<i>S. hartwegii</i> N.E.Br.	München (BT)	1965 (M)	0,10	0,05
<i>S. hirsuta</i> Dunal.	München (BT)	1846 (M)	0,67	5,8

bei Scopolia caulescens und Hyoscyamus orthocarpus traten relativ hohe Hyoscyamingehalte auf. Es konnte daher trotz der Ausnahmen gefolgert werden, daß der Gehalt von Hyoscyamin und Scopolamin ein durchgehendes Merkmal der genannten Gattungen sei.

In der anfangs zitierten Literatur werden für diese Alkaloide zwei weitere Solanaceen-Gattungen genannt. Der Genus Atropanthe wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht als eigenständige Gattung aufgenommen, da ihr Vertreter Atropanthe sinensis Pascher im Staatsherbar München als Scopolia sinensis Hemsley bestimmt wurde. Für den Genus Salpichroa konnte bei neun untersuchten Proben aus zwei Arten keines der beiden Alkaloide nachgewiesen werden. Da der Nachweis für Hyoscyamin auch in der Originalliteratur (EVANS et al., 1972) mit "possibly trace quantities" bewertet wurde, ist das Vorkommen von Tropasäureestern in dieser Gattung bisher nicht nachgewiesen.

Innerhalb der Art Datura candida wurden für den Scopolamingehalt dreimal Werte von 0,02 bis 0,05 % gefunden. Ein Wert wich davon mit 1,77 % stark ab. Dabei fiel auf, daß diese Pflanze aus Peru auf dem Herbarbogen früher als Datura sanguinea bestimmt war. Die Unterscheidung der beiden Arten ist also recht schwierig. Der hohe Alkaloidgehalt stünde in Einklang mit der älteren Namensgebung und könnte Anlaß sein, die Einordnung nochmals zu überprüfen. Auf diese Weise lieferte die enzymimmunologische Untersuchung von Herbarproben zusätzliche Hinweise für eine Bestimmung auf der Ebene der Art.

6.2. Vorkommen von Tropasäureestern in anderen Gattungen des Pflanzenreichs

Vereinzelt wurde das Vorkommen der Alkaloide Hyoscyamin und Scopolamin für bisher nicht erwähnte Gattungen beschrieben. RAFFAUF (1970) nennt die Arten Solanum dulcamarum, Amanita muscaria, Lautia venenosa und Utricularia physalis. Die zitierte Literatur aber belegt in den ersten beiden Fällen das Vorkommen von Atropin nicht (WELLS und REEDER, 1908; TYLER und GRÖGER, 1964) und bei Lautia handelt es sich um die falsche Schreibweise von Latua (BODENDORF und KUMMER, 1962). Aus Utricularia physalis, Lentibulariaceae, wurde die Isolierung von Scopolamin veröffentlicht (PESHKOV, 1966). Der jüngste Nachweis betrifft Heisteria olivae, Olacaceae, aus deren Früchten Scopolamin isoliert wurde. Die Identifizierung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, UV- und NMR-Spektrum (CAIRO VALERO et al., 1977).

Von Utricularia physalis stand kein Material zur Verfügung. Die Untersuchung der in Tabelle 19 aufgeführten Arten dieser Gattung aus dem Staatsherbar München brachte in keinem Fall den Nachweis von Hyoscyamin oder Scopolamin. Die Nachweisgrenzen von III.6.1. galten auch hier.

Die Art Heisteria olivae wird heute mit H. latifolia bezeichnet (SLEUMER, 1984). Der New York Botanical Garden stellte die Proben zur Verfügung, die neben anderen Arten dieser Gattung untersucht wurden. Wie Tabelle 20 zeigt, wurde in beiden Herkunftsn von H. latifolia ein geringer Gehalt an Scopolamin gemessen. Dieses ungewöhnliche Vorkommen des Alkaloids konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durch einen Strukturnachweis erhärtet werden. Dafür stand ausreichendes Probenmaterial nicht zur Verfügung.

Tab. 19: Untersuchte Arten der Gattung Utricularia: in den Herbarproben wurde weder Hyoscyamin noch Scopolamin nachgewiesen.

Art aus dem Genus <i>Heisteria</i> , <i>Olacaceae</i>	Herkunft, Jahr der Her- barisierung und Herbar		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
<i>H. acuminata</i> (H.+B.)Engl.	Venezuela	1981 (M)	0	0
<i>H. barbata</i> Cuat.	Brasilien	1973 (M)	0	0
<i>H. citrifolia</i> Engl.	Brasilien	1932 (M)	0	0
<i>H. costaricensis</i> Donn.Sm.	Costa Rica	? (M)	0	0
<i>H. densifrans</i>	Brasilien	1974 (M)	0	0
<i>H. duckei</i> Sleumer	Venezuela	1970 (M)	0	0
<i>H. latifolia</i> Standl.	Venezuela	1970 (NY)	0	0,89
	Ecuador	1969 (NY)	0	1,2
<i>H. laxiflora</i> Engl.	Brasilien	1972 (M)	0	0
<i>H. macrophylla</i> Oerst.	Guatemala	? (M)	0	0
<i>H. microcalyx</i> Sagot.	Brasilien	1971 (M)	0	0
<i>H. nitida</i> Spruce ex Engl.	Brasilien	1933 (M)	0	0
<i>H. ovata</i> Benth.	Brasilien	1973 (M)	0	0
	Brasilien	1933 (M)	0	0
<i>H. parviflora</i> Sm.	Kamerun	1969 (M)	0	0
<i>H. pentandra</i> (Benth. ex Reissek) Engl.	Brasilien	1851 (M)	0	0
<i>H. perianthomega</i> Engl.	Brasilien	1968 (M)	0	0
<i>H. scandens</i> Dueke	Brasilien	1971 (M)	0	0
<i>H. silvanii</i> Schwacke	Brasilien	1971 (M)	0	0
<i>H. spruceana</i> Engl.	Brasilien	1974 (M)	0	0
<i>H. zimmereri</i> Engl.	Kamerun	1968/70 (M)	0	0

Tab. 20: Untersuchte Herbarproben von Arten aus der Gattung
Heisteria (*Olacaceae*)

6.3. Tropanalkaloide in Pflanzen verschiedener Solanaceen-Arten

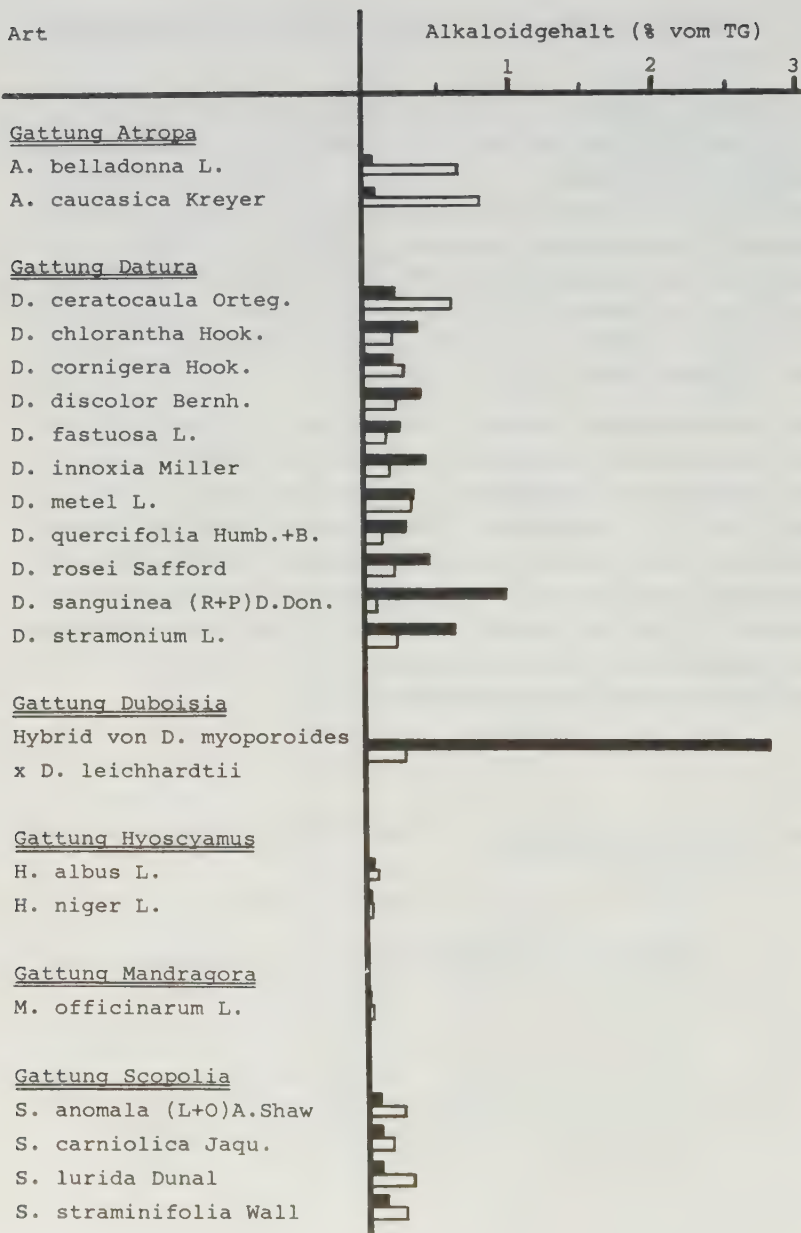
Von einigen Solanaceen-Arten standen neben dem Herbarmaterial auch Pflanzen und damit frisches Material für immunologische Bestimmungen zur Verfügung. Pflanzen des Duboisia-Hybrids und von Mandragora officinarum wurden seit mehreren Jahren im Gewächshaus gehalten. Die übrigen Pflanzen wurden aus Samen herangezogen, die von Botanischen Gärten in aller Welt erbeten wurden (s. II.1.). In Abbildung 26 wurden die in den Blattproben gefundenen Alkaloidgehalte nach Gattungen zusammengefaßt und verglichen.

Die Untersuchungen ergaben die höchsten Scopolamingehalte für die Blätter der Duboisia-Hybride und einiger Datura-Arten, während die Atropa-Arten recht hohe Hyoscyamingehalte aufwiesen. Die niedrigsten Gehalte fanden sich bei Mandragora-Blättern. Diese Ergebnisse stimmten gut mit dem aus der Literatur bekannten Alkaloidspektrum der Solanaceen überein (EVANS, 1979). Sie belegen auch, warum Australien als Heimat der Duboisia zum Hauptlieferanten von Scopolamin auf dem Weltmarkt werden konnte (PEARN, 1981).

Abb. 26: Alkaloidgehalte in frischen Blättern verschiedener Solanaceen-Arten.

□ Hyoscyamin und ■ Scopolamin in % vom TG

Duboisia- und Mandragora-Pflanzen wurden seit einigen Jahren im Gewächshaus kultiviert; Samen verschiedener Herkünfte dienten der Anzucht der übrigen Pflanzen, die zum Zeitpunkt der Probennahme drei Monate alt waren; die Vertreter der Gattungen Atropa und Datura wuchsen auf einem Versuchsfeld, die anderen Pflanzen in Kunststofföpfen im Gewächshaus. Von jeder Art standen mindestens drei Pflanzen zur Verfügung. Probennahme und Gehaltsbestimmung s. II.1.



6.4. Tropanalkaloide in Populationen einzelner Solanaceen-Arten

Der Alkaloidgehalt von im Freiland gezogenen, drei Monate alten Pflanzen der Arten Datura stramonium und Atropa belladonna sowie von Duboisia-Hybriden aus Gewächshäusern wurde bestimmt. Die Häufigkeitsverteilungen der gefundenen Gehalte sind in den Abbildungen 27 bis 29 dargestellt.

Die Scopolamingehalte schwankten bei Datura stramonium zwischen 0,10 und 0,82 %, bei Atropa belladonna zwischen 0,015 und 0,12 % und bei Duboisia myoporoides x Duboisia leichhardtii zwischen 0,15 und 5,5 %, bezogen auf das Trockengewicht des Blattmaterials. Für Hyoscyamin betrugen die Bandbreiten bei Datura stramonium 0,04 bis 0,45%, bei Atropa belladonna 0,18 bis 1,3 % und bei den Duboisia-Hybriden 0,038 bis 0,76 %. Dies zeigte, daß innerhalb einer Art deutliche Unterschiede im Alkaloidgehalt der Einzelpflanzen auftraten. Bei Datura stramonium und Atropa belladonna wurden die Kulturbedingungen durch gemeinsame Aussaat und Anzucht der Pflanzen einer Art weitmöglichst vereinheitlicht. Die Duboisia-Hybride hatten eine gemeinsame Herkunft, wurden dann aber in den Gewächshäusern der Universität München und der Universität Bochum unter unterschiedlichen Bedingungen gehalten. In Bochum wuchsen die Pflanzen in einem Gemisch aus zwei Dritteln Bimsstein und einem Drittel Erde bei 85% rel. Feuchte und 25°C. Das Absinken der Temperatur auf Werte unter 18°C wurde ausgeschlossen. In München fand Blumenerde Verwendung, die rel. Feuchte am etwas weniger hellen Standort betrug 60-80%, die Temperatur lag bei durchschnittlich 20-22°C. Diese Umwelteinflüsse wirkten sich deutlich auf den Scopolamingehalt aus. Während alle Proben aus München im Bereich von 0,15 bis 1,7 % lagen, traten bei den Pflanzen aus Bochum höhere Gehalte auf (s. Abbildung 29). Die Häufigkeitsverteilung des Hyoscyamingehalts belegte keinen deutlichen Einfluß des Standorts dieser Pflanzen.

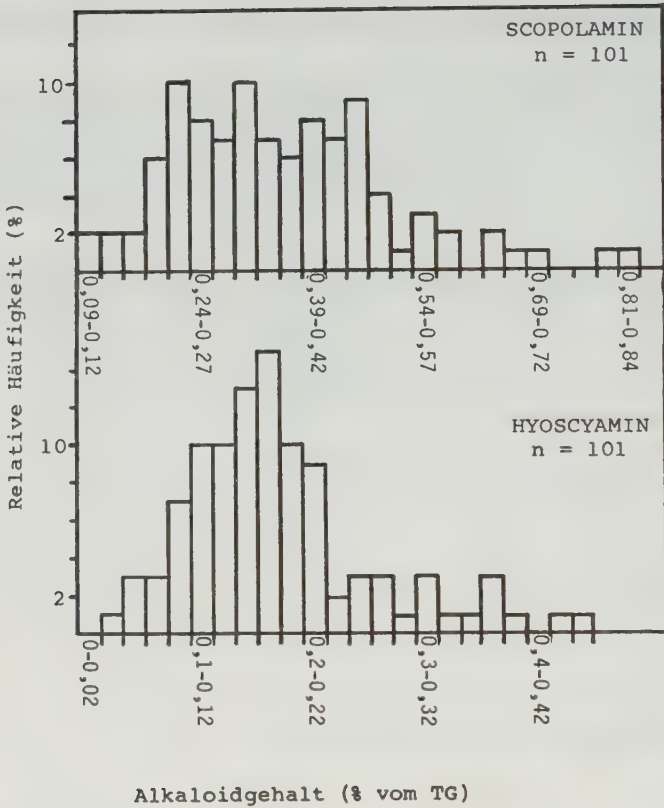


Abb. 27: Häufigkeitsverteilung von Scopolamin- und Hyoscyamingehalt der Blätter (angegeben in % vom TG) in einer Population von Datura stramonium. Die Pflanzen wurden aus Samen verschiedener Herkünfte angezogen und in einem Versuchsfeld ausgepflanzt; ihr Alter zum Zeitpunkt der Probennahme betrug drei Monate. Probennahme und Gehaltsbestimmungen s. II.1.

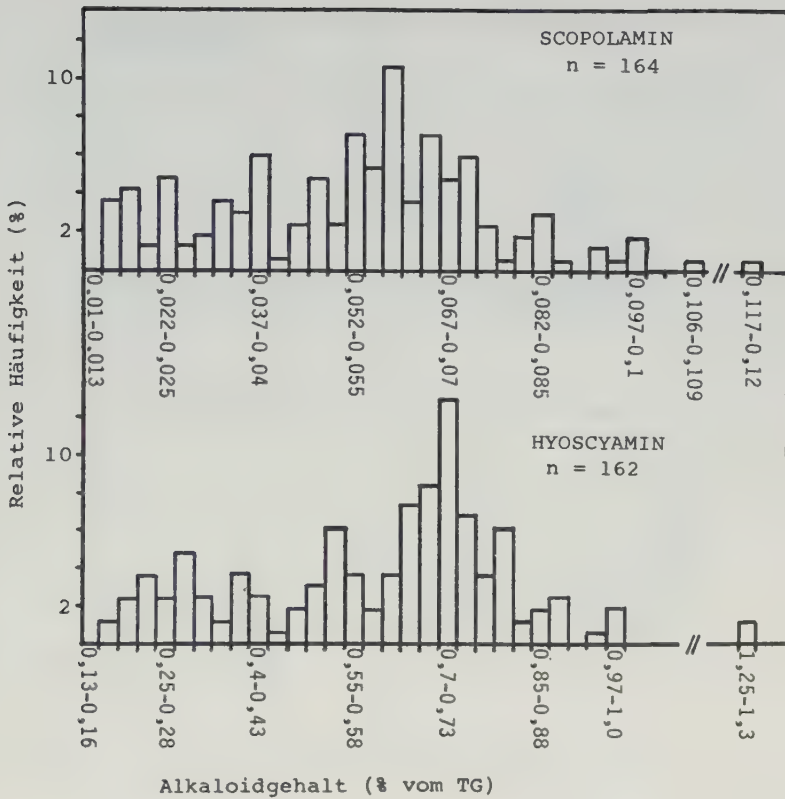


Abb. 28: Häufigkeitsverteilung von Scopolamin- und Hyoscyamingehalt der Blätter (angegeben in % vom TG) in einer Population von *Atropa belladonna*. Die Pflanzen wurden aus Samen verschiedener Herkünfte angezogen und in einem Versuchsfeld ausgepflanzt; ihr Alter zum Zeitpunkt der Probennahme betrug drei Monate. Probennahme und Gehaltsbestimmungen s. II.1.

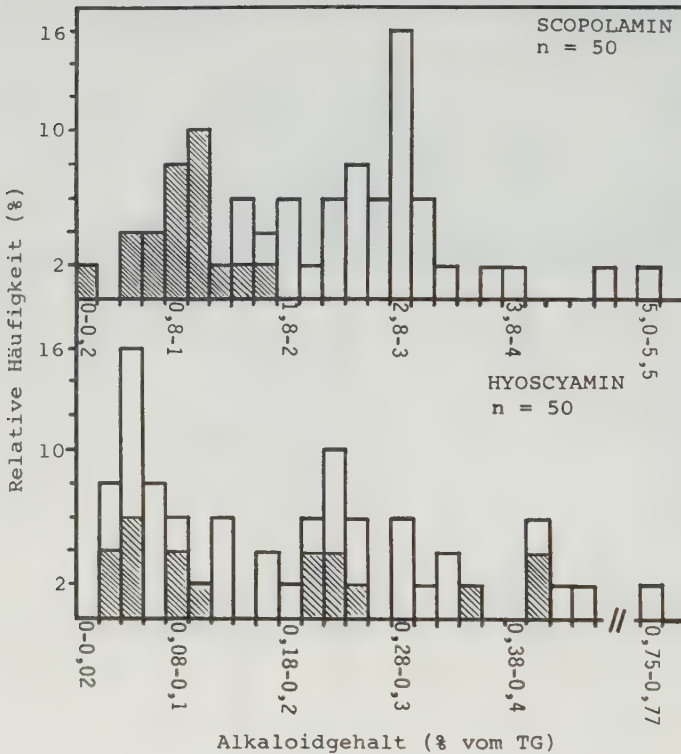


Abb. 29: Häufigkeitsverteilung von Scopolamin- und Hyoscyamingehalt der Blätter (angegeben in % vom TG) in einer Population von *Duboisia*-Hybriden. Die Pflanzen wurden aus Samen verschiedener Herkünfte angezogen und in einem Versuchsfeld ausgepflanzt; ihr Alter zum Zeitpunkt der Probennahme betrug drei Monate. Probennahme und Gehaltsbestimmungen s. II.1. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Werte der im Gewächshaus der Universität München kultivierten Pflanzen (20-22°C, 60-80% rel. Feuchte); die übrigen Pflanzen standen im Gewächshaus der Universität Bochum (25°C, 85% rel. Feuchte).

6.5. Tropanalkaloide in Einzelpflanzen verschiedener Solanaceen-Arten

Alle Blätter einer mehrere Jahre alten Mandragora officinarum aus dem Gewächshaus des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München wurden auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse und ihre Auswertung. Auffallend war die ungleichmäßige Verteilung der Alkaloide. Auf die beiden jüngsten Blätter, die zusammen 24% des Trockengewichts der oberirdischen Pflanzenteile ausmachten, entfielen 79% des gesamten enthaltenen Hyoscyamins und 31% des Scopolamins.

Die fehlende Ausscheidung stickstoffhaltiger Verbindungen bei Pflanzen wurde als Grund für das Vorkommen der Alkaloide in der Pflanze vorgeschlagen (MOTHES et al., 1985). Die Ergebnisse belegten dies für Hyoscyamin in der Mandragora-Pflanze nicht. Gerade welkende, absterbende Pflanzenteile sollten Alkaloide enthalten, wenn sie für die Pflanze diese Funktion hätten.

Aus dem Wurzelstock dieser Mandragora-Pflanze wurde eine Wurzel mit ihren Seitenwurzeln isoliert und in kleinen Abschnitten auf ihren Hyoscyamingehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Teile der Wurzel zeichneten sich durch sehr unterschiedlichen Hyoscyamingehalt aus. Dies galt auch für solche Seitenwurzeln, die sich in ihrem Aussehen und ihrer Stellung in der Wurzel sehr ähnlich waren.

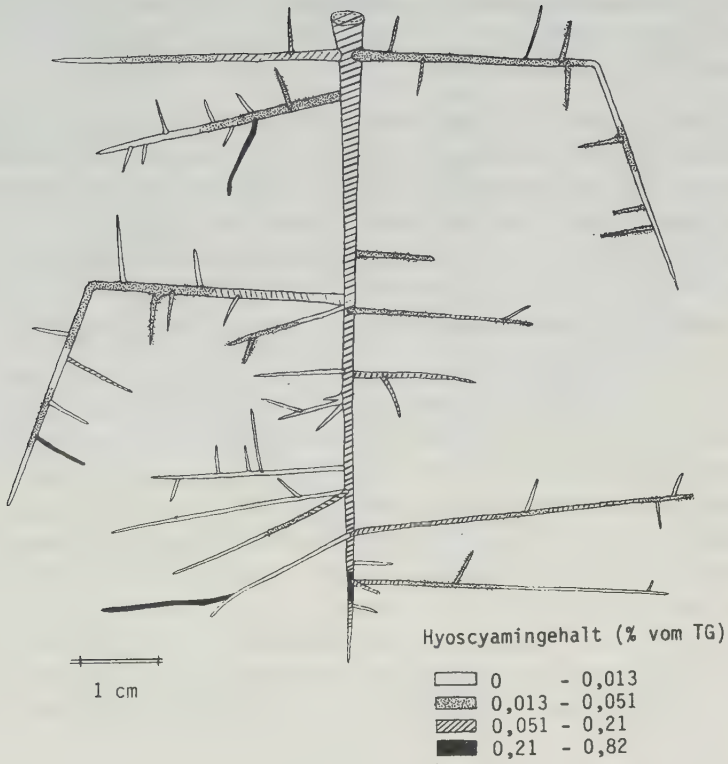
Im folgenden sollte die Verteilung der beiden Alkaloide im Wurzelstock verschiedener Solanaceen-Arten untersucht werden. Wurden die Pflanzen in Erde gezogen, ließ sich das Untersuchungsmaterial schwer gewinnen. Beim Entfernen der Erde ging stets ein Teil der feineren Wurzeln verloren. Außerdem konnte ein Auswaschen von Alkaloiden durch das notwendige Abwaschen der Wurzeln nicht ausgeschlossen werden.

Bessere Möglichkeiten bot die Anzucht der Pflanzen in Hydro-

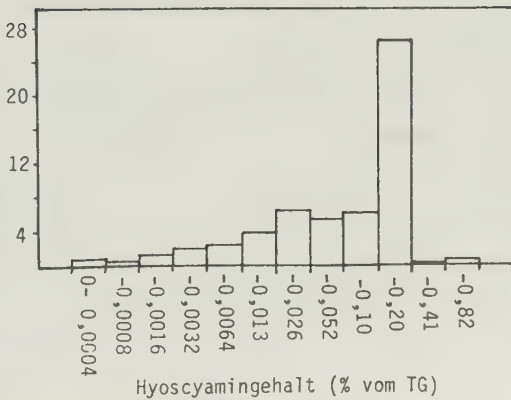
Blatt	Beschreibung des Blatts	TG (mg)	Scopolamin-gehalt (%TG)	Hyoscyamin-gehalt (%TG)
1	jüngstes Blatt	200	0,00533	0,287
2	zweitjüngstes Blatt	460	0,00322	0,0914
3	großes Blatt	520	0,00266	0,0198
4	großes Blatt	500	0,00323	0,0291
5	großes Blatt, leicht verwelkt	370	0,00294	0,00407
6+7	älteste Blätter, verwelkt	650	0,00258	0,000290

prozentualer Anteil des Blattes an			
Blatt	Gesamt- trocken- gewicht	Gesamtmenge des enthaltenen Alkaloids Scopolamin	Hyoscyamin
1	7,4	12,9	45,6
2	17,0	17,8	33,3
3	19,3	16,6	8,2
4	18,5	19,4	11,6
5	13,7	13,1	1,2
6+7	24,1	20,2	0,1

Tab. 21: Alkaloidgehalt im oberirdischen Teil einer Pflanze von Mandragora officinarum L.



Trockengewicht aller Wurzeln
in einem Gehaltsbereich (mg)



kultur und ihre Aufarbeitung nach II.1.3. Hier wurde der Wurzelstock nahezu vollständig für die Untersuchung erfaßt. Alle von der Hauptwurzel abzweigenden Seitenwurzeln wurden abgetrennt und einzeln auf ihren Gehalt an Scopolamin und Hyoscyamin untersucht.

Als Bezugsgröße für die Berechnung der Gehalte diente das Gewicht jeder Probe nach der Extraktion und anschließender Trocknung. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 22 und 23 zusammengefaßt. Die Häufigkeitsverteilung der Gehalte entsprach nicht einer Normalverteilung. Als Vergleichsgröße für die Variation der Alkaloidgehalte in einem Wurzelstock wurde dennoch die Standardabweichung vom Mittelwert verwendet.

Die Auswertung ergab innerhalb einer Pflanze eine starke Variation der Alkaloidgehalte, die anhand der immunologischen Bestimmungsverfahren nachgewiesen werden konnte. Zur Kontrolle wurde die Variation untersucht, die sich durch die Testverfahren ergab. Sie betrug für den Hyoscyamin-Radioimmuntest 4,5% innerhalb des Tests und 9,4% zwischen verschiedenen Tests. Beim Scopolamin-Enzymimmuntest lagen die entsprechenden Werte bei 5,5% und 12% (vgl. Tabelle 11). Eine etwas größere Bandbreite wurde erhalten, wenn der Gehalt von pulverisiertem Drogenmaterial in den Extrakten mehrerer Aliquots bestimmt wurde. Die Standardabweichung betrug hier

Abb. 30: Verteilung des Hyoscyamingehaltes in einer Wurzel von Mandragora officinarum.
Aus dem Wurzelstock einer mehrere Jahre alten Mandragora-Pflanze wurde eine Wurzel isoliert und in 193 Teile zerlegt. Die Abschnitte waren maximal 10 mm lang, ihr Durchmesser betrug maximal 4 mm. Die Proben wurden sofort nach II.1.3. aufgearbeitet. Der Hyoscyamingehalt wurde für das Gewicht der Proben nach Extraktion und anschließender Trocknung berechnet. Seine Höhe wird durch die Farbe ausgedrückt, in der ein Abschnitt dargestellt ist. Der Scopolamingehalt lag niedriger, in vielen Extrakten unter der Nachweisgrenze.
Im Histogramm wird die Häufigkeit der einzelnen Gehalte in Bezug auf das Wurzeltrockengewicht gezeigt.

Art	Proben- zahl	Hyoscyamingehalt (% vom TG)			
		Mittel- wert	sd	Max.	Min.
<i>Atropa belladonna</i> L.	16	0,0368	0,0360	0,113	0,00135
			= 98%		
<i>Datura rosei</i> Safford	41	0,0342	0,0308	0,117	0,00242
			= 90%		
<i>Datura sanguinea</i> (R.+P.) D.Don.	39	0,148	0,112	0,445	0,0255
			= 75%		
<i>Datura stramonium</i> L.	53	0,0173	0,0243	0,157	0
			= 140%		
<i>Datura versicolor</i> Safford	25	0,0211	0,0290	0,135	0,00348
			= 137%		
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	28	0,109	0,105	0,298	0
			= 96%		
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	21	0,208	0,147	0,612	0,0295
			= 71%		
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	20	0,00466	0,00258	0,0103	0,00185
			= 55%		

Tab. 22: Variation der Gehalte an Hyoscyamin in den Wurzeln einzelner Solanaceen-Pflanzen.

Aufarbeitung und Gehaltsbestimmung s. II.1.3.

Die Pflanzen wurden in Hydrokultur angezogen (s. II.1.1.); zum Zeitpunkt der Untersuchung lag ihr Alter zwischen 11 und 17 Wochen.

Die Probenzahl gibt die Anzahl der Einzelwurzeln wieder, in die sich der Wurzelstock zerlegen ließ.

14 bzw. 15% vom Mittelwert im Hyoscyamin-Radioimmunttest bzw. Scopolamin-Enzymimmunttest. Die Meßwerte verschiedener Verdünnungen eines Extrakts ergaben für den Gehalt eine Variation von 8 bzw. 10%, die Verdünnung verursachte also einen Fehler von 4%. Die Variation der Alkaloidgehalte in einer Pflanze war damit deutlicher größer als der Fehler der Testverfahren.

Art	Proben- zahl	Scopolamingehalt (% vom TG)			
		Mittel- wert	sd	Max.	Min.
Atropa belladonna L.		alle Werte unter der Nachweisgrenze			
Datura rosei Safford	41	0,0113	0,0143 = 127%	0,0767	0
Datura sanguinea (R.+P.) D.Don.	39	0,0138	0,0129 = 95%	0,0568	0
Datura stramonium L.	53	0,00518	0,00540 = 104%	0,0258	0
Datura versicolor Safford	25	0,0289	0,0288 = 100%	0,145	0,00371
Hyoscyamus albus L.	28	0,0586	0,0535 = 91%	0,202	0
Hyoscyamus aureus L.	21	0,0559	0,0251 = 45%	0,110	0,0172
Hyoscyamus niger L.	20	0,0101	0,00475 = 47%	0,0242	0,00410

Tab. 23: Variation der Gehalte an Scopolamin in den Wurzeln einzelner Solanaceen-Pflanzen.
 Aufarbeitung und Gehaltsbestimmung s. II.1.3.
 Die Pflanzen wurden in Hydrokultur angezogen (s. II.1.1.); zum Zeitpunkt der Untersuchung lag ihr Alter zwischen 11 und 17 Wochen.
 Die Probenzahl gibt die Anzahl der Einzelwurzeln wieder, in die sich der Wurzelstock zerlegen ließ.

7. Vorkommen von Tropanalkaloiden in pflanzlichen Zellkulturen

7.1. Untersuchung von Kalluskulturen verschiedener Solanaceen-Arten

Bisherige Untersuchungen zur Produktion von Hyoscyamin und Scopolamin in pflanzlichen Zellkulturen ergaben stets nur sehr geringe Gehalte. Zum Teil konnten auch keine Alkaloide nachgewiesen werden (vgl. die Übersicht bei KURZ und CONSTABEL, 1985). Pflanzliche Zellkulturen zeigen jedoch häufig sehr unterschiedliche Eigenschaften, wenn sie in verschiedenen Labors etabliert wurden. Umwelteinflüsse und andere Faktoren wirken auf vielfältige Weise zusammen und können zu nicht vorhersehbaren Ergebnissen führen. Es wurden daher Kulturen einiger Solanaceen-Arten aufgebaut und mittels der immunologischen Testverfahren auf ihren Alkaloidgehalt untersucht.

Die Kalluskulturen wurden gemäß II.2.4. begründet und angezogen. Das untersuchte Material stammte von Kulturen, die nach der Kallusbildung zweimal in vierwöchigem Abstand ohne Reste des differenzierten Pflanzenmaterials auf frisches Medium übertragen worden waren. Daneben wurden einige Kalluskulturen untersucht, die sich schon seit längerer Zeit in der Zellkultursammlung des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität München befanden. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 24. Alle gefundenen Gehalte liegen deutlich niedriger als die der differenzierten Pflanze (vgl. III.6.). Kein unmittelbarer Zusammenhang bestand zwischen dem Alkaloidgehalt der einzelnen Art in differenziertem Zustand und als Kalluskultur. Zum Beispiel enthielten Kulturen von Hyoscyamus albus L. deutlich mehr Hyoscyamin und Scopolamin als die Kalli von Datura stramonium L. oder Datura rosei Safford. In der differenzierten Pflanze lagen umgekehrte Verhältnisse vor.

Am Institut für Botanik der Ukrainischen Akademie der Wissen-

Art	Herkunft der Samen und Kulturmedium		Alkaloidgehalt (10 ⁻³ % des TG)	
			Hyosc.	Scop.
<i>Datura chlorantha</i> Hook.	Nijmegen	LS	2,00	0,445
<i>Datura fastuosa</i> L.	Gatersleben	LS	0,152	0,390
<i>Datura fastuosa</i> L.	Gatersleben	B5CM	0,0112	0,234
<i>Datura ferox</i> L.	Zellkultursammlung	LS	0	0
<i>Datura innoxia</i> Miller	Stuttgart	LS	0,148	2,12
<i>Datura innoxia</i> Miller	Stuttgart	4X	0,0048	0,347
<i>Datura metel</i> L.	Nijmegen	LS	2,77	2,33
<i>Datura meteloides</i> Dl.	Zellkultursammlung	LS	0,0231	0
<i>Datura rosei</i> Safford	Poznan	B5CM	0,0144	0
<i>Datura sanguinea</i> (R+P)D.Don.	Rumänien	4X	0	0
<i>Datura sanguinea</i> (R+P)D.Don.	Rumänien	B5CM	0,121	0
<i>Datura stramonium</i> L.	München	B5CM	0,0848	0
<i>Datura stramonium</i> L.	Berlin-Dahlem	4X	0,0287	0
<i>Duboisia</i> -Hybrid	Zellkultursammlung	LS	0,0424	0,107
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Stuttgart	LS	1,32	1,74
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Dresden	LS	0,433	0,246
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Göttingen	LS	0,104	0,171
<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	Kairo	LSY	3,80	0,032
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	Zellkultursammlung	LS	0,0297	0,0450
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	Zellkultursammlung	B5CM	0,0320	0,0643
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	Zellkultursammlung	4X	0,0126	0,0393
<i>Scopolia lurida</i> Dunal	Lodz	LS	0,0690	0,178

Tab. 24: Untersuchte Kalluskulturen von Solanaceen-Arten und ihr Gehalt an den Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin.
 Kultivierung auf Festmedium in Petrischalen (s. II.2)
 Die Probenahme für die Gehaltsbestimmung erfolgte 23-28 Tage nach dem Überimpfen auf frisches Medium.
 Kulturen aus der Zellkultursammlung wurden seit ihrer Anlage mehrere Jahre kultiviert; die neuangelegten Kulturen entstanden aus sterilen Keimlingen (s. II.2.4.); sie wurden vor der Gehaltsbestimmung zweimal in vierwöchigem Abstand ohne Reste differenzierten Gewebes auf frisches Mediums übertragen.

schaften in Kiew werden unter Leitung von Dr. Gleba Fusions- experimente mit pflanzlichen Protoplasten durchgeführt. Es gelang so, Zellen von Atropa belladonna L. und Nicotiana tabacum L. zu verschmelzen. Die Hybride wurden als Kallus- kulturen auf MS-Medium kultiviert. Die Ursprungsgewebe, eine Atropa belladonna-Pflanze und Kallus von Nicotiana tabacum, Kallus der Atropa belladonna sowie acht verschiedene Hybride wurden auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. Die Angaben be- ziehen sich auf das Trockengewicht, die Nachweisgrenzen la- gen bei 0,00001% oder niedriger. Die differenzierte Pflanze, die zur Gewinnung der Protoplasten von Mesophyllzellen dien- te, wurde seit der Fusion unter sterilen Bedingungen auf MS-Medium kultiviert. Sie enthielt 0,004% Hyoscyamin und 0,0008% Scopolamin. Die Proben der untersuchten Kalli wurden am Ende einer vierwöchigen Kulturperiode entnommen. Die un- differenzierten Kallusgewebe der Stammpflanzen und aller Hy- bride enthielten keines der beiden Tropanalkaloide. Der Kal- lus eines Hybrids zeigte erste Redifferenzierungen in Form von grünen Sprossen. In diesem Gewebe wurde 0,00002% Hyos- cyamin gefunden. Die Gewebekulturen der untersuchten Fusionsprodukte waren also zur Produktion der Tropasäure- ester nicht geeignet.

7.2. Untersuchung von Suspensionskulturen

Die Gewebekulturen des Duboisia-Hybrids und von Datura mete- loides wurden in Suspensionskultur in LS-Medium überführt. Sie zeigten mit einem Trockengewichtsgehalt von 14 g/l Medi- um nach neuntägiger Kultivierung gute Wachstumseigenschaften. Die Alkaloide Hyoscyamin und Scopolamin waren jedoch weder im Zellmaterial noch im Medium nachweisbar.

Die Frage, ob unter dem Einfluß der richtigen Medienzusätze diese Suspensionskulturen pflanzlicher Zellen zur Biosynthe- se der beiden Tropanalkaloide fähig wären, mußte ungeklärt bleiben. Versucht wurde die Kultur in einer Mischung glei- cher Teile frischen LS-Mediums und konditionierten LSY-Medi-

ums, in dem zuvor eine Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61 (s. III.9.) drei Wochen lang gewachsen war. Trotz der zu beobachtenden Alkaloidbiosynthese in der Wurzelkultur enthielt das Medium keine Komponenten, die die Zellkulturen zur Biosynthese von Hyoscyamin oder Scopolamin angeregt hätten.

8. Vorkommen von Scopolamin in Organkulturen verschiedener Solanaceen-Arten

Pflanzliche Organkulturen bieten die Möglichkeit, differenziertes Pflanzenmaterial an Stelle der nicht organisierten Zellen von Gewebekulturen heranzuziehen. In früheren Veröffentlichungen, z.B. von HASHIMOTO et al. (1986), wurden für diese Kulturen Hyoscyamin- und Scopolamingehalte beschrieben, die denen intakter Pflanzen vergleichbar waren (vgl. I). Für die Produktion von Scopolamin wurden daher Wurzelkulturen verschiedener Solanaceen-Arten erprobt.

Die Kulturen wurden nach dem unter II.3. beschriebenen Verfahren angelegt. Bei den Versuchen zur Begründung von Suspensionskulturen wurden nur Wurzelstücke in die Kolben überführt, die auf dem Festmedium Längenwachstum zeigten. Dies war am Vorliegen feiner, weißer Wurzelspitzen erkennbar. Als Standardmedium für diese Versuche diente stets RS-Medium. Nach dreiwöchigem Wachstum wurde aus dem Wurzelgewebe eine neue Erhaltungskultur angelegt. Der übrige Teil der Wurzeln wurde gemäß II.3.5 aufgearbeitet. Der Scopolamin-Enzymimmuntest diente der Bestimmung des Alkaloidgehalts. In der Tabelle 25 erscheinen die Ergebnisse für verschiedene Arten.

Es wurde deutlich, daß unter den Hyoscyamus-Arten Wurzeln mit der angestrebten Produktion von Scopolamin zu finden waren. Die Produktionsleistung einer Kultur wird durch den Gehalt des Pflanzenmaterials an dem Alkaloid, bezogen auf das Trockengewicht, jedoch nicht ausreichend beschrieben. Diese Be-

Art	Herkunft der Samen	Scopolamingehalt (% vom TG)
<i>Atropa belladonna</i> L.	München	0,00081
<i>Datura chlorantha</i> Hook.	Nijmegen	kein Wachstum
<i>Datura rosei</i> Safford	Poznan	kein Wachstum
<i>Datura sanguinea</i> (R.+P.) D. Don.	Rumänien	kein Wachstum
<i>Datura stramonium</i> L.	Ulm	0,0893
<i>Datura stramonium</i> L.	* München	0,279
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Frankfurt/M.	0,188
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	* Göttingen	0,174
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	* Dresden	0,293
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	Stuttgart- Hohenheim	0,283
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	* Wuppertal	0,300
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	* (unbekannt)	0,496
<i>Hyoscyamus aureus</i> L.	* Peloponnes	0,180
<i>Hyoscyamus bohemicus</i> Schmidt	Oxford	0,0262
<i>Hyoscyamus desertorum</i>	* Peloponnes	0,266
(Aschers. ex Boiss.) Täckholm		
<i>Hyoscyamus desertorum</i>	* Gatersleben	0,170
<i>Hyoscyamus x gyorffi</i>	* Oxford	0,215
<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	Kairo	kein Wachstum
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	* Stuttgart- Hohenheim	0,345
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	* Warschau	0,315
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	* Tübingen	0,107
<i>Hyoscyamus pusillus</i> L.	* Moskau	0,128
<i>Hyoscyamus reticulatus</i> L.	Erevan	0,0138
<i>Scopolia lurida</i> Dunal	Lodz	kein Wachstum

Tab. 25: Untersuchte Wurzelkulturen von Solanaceen-Arten und ihr Gehalt an dem Tropanalkaloid Scopolamin. Kultivierung in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 30 ml RS-Medium, Probennahme am Ende der dreiwöchigen Kulturperiode.

Aufarbeitung und Gehaltsbestimmung s.II.3.5.

* Kultur wurde für weitere Versuche berücksichtigt (nähere Angaben im Text)

trachtungsweise läßt das unterschiedliche Wachstum der Kulturen außer acht. Deshalb muß auch für Wurzelkulturen der Gehalt an Metaboliten in Suspensionskulturen stets als Gewichtsmenge pro Volumeneinheit ausgedrückt werden (ZENK und DEUS, 1982), wenn die Produktionsleistung beurteilt werden soll.

Visuelle Kontrolle und einfaches Abschätzen der Wachstumseigenschaften aller in der Tabelle 25 verzeichneten Kulturen erlaubten es, einige Kulturen von der weiteren Bearbeitung auszuschließen. Bei den übrigen, in der Tabelle 25 durch einen Stern markierten Kulturen wurde das Wachstum und die Scopolaminproduktion unter einheitlichen Bedingungen untersucht. Die Abbildung 31 stellt die Ergebnisse der höchstproduzierenden Kulturen zusammen, die für die ausgewählten Arten erhalten wurden.

Nach der Auswahl einer Scopolamin produzierenden Kultur sollte die Biotransformation von Hyoscyamin zu Scopolamin untersucht werden. Ein möglichst hoher Anteil des Scopolamins am Gesamtalkaloidgehalt der Wurzeln war daher wünschenswert. Der Hyoscyamin-Radioimmunttest stand zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch nicht zur Verfügung. Deshalb wurde das Verhältnis der in den Wurzelkulturen vorhandenen Tropanalkaloide nach Dünnschichtchromatographie an Hand der Fläche der detektierten Zonen abgeschätzt.

Nach der Bestimmung der in Abbildung 31 gezeigten Alkaloidgehalte wurden die Extrakte im Luftstrom eingetrocknet. Der Rückstand wurde dünnschichtchromatographisch mit dem Laufmittelsystem 3 (s. II.7.1.) aufgetrennt, die Detektion erfolgte mit dem Reagens nach Dragendorff. Bei allen Wurzelextrakten waren nur zwei Inhaltsstoffe deutlich zu erkennen, die durch Vergleich mit den Referenzsubstanzen als Hyoscyamin und Scopolamin identifiziert wurden. In den Kulturen von Datura stramonium und Hyoscyamus albus überwog das Hyoscyamin, während bei Hyoscyamus niger stets Scopolamin als Hauptalkaloid auftrat. Bei Hyoscyamus desertorum, Hyoscyamus gyorffi und Hyoscyamus pusillus traten die Alkaloide in unge-

fähr gleichen Anteilen auf. Dies galt auch für einen Teil der Kulturen von Hyoscyamus aureus, wo in den anderen Proben überwiegend Scopolamin enthalten war.

Für die weiteren Untersuchungen wurden wegen ihres Alkaloidgehalts die Kulturen Hd (= Hyoscyamus desertorum, Peloponnes) und Hn (= Hyoscyamus niger, Warschau) ausgewählt. Trotz ihrer vergleichbaren Möglichkeiten schienen Kulturen von Hyoscyamus aureus weniger geeignet, da sie nach mehrmaliger Subkultivierung immer wieder sehr schlechte Wachstumseigenschaften zeigten.

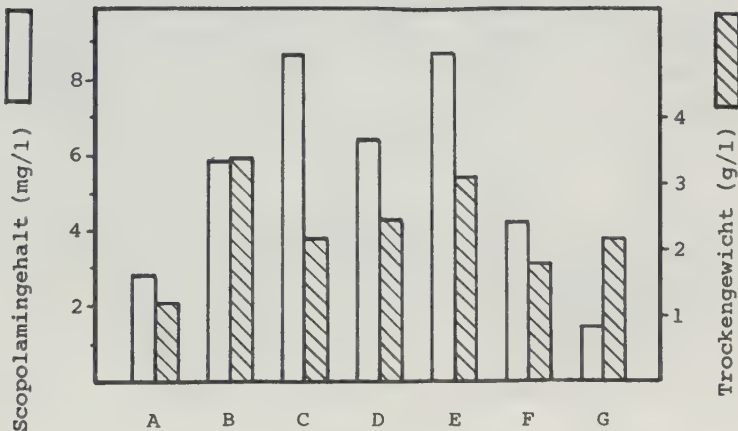


Abb. 31: Der Scopolamingehalt von Wurzelkulturen verschiedener Solanaceen-Arten

- | | |
|------------------------------|--------------------------------|
| A <u>Datura stramonium</u> | B <u>Hyoscyamus albus</u> |
| C <u>Hyoscyamus aureus</u> | D <u>Hyoscyamus desertorum</u> |
| E <u>Hyoscyamus niger</u> | F <u>Hyoscyamus gyorffi</u> |
| G <u>Hyoscyamus pusillus</u> | |

Kultivierte Wurzeln (40 mg TG) wurden in 75 ml RS-Medium in 300ml-Erlenmeyerkolben angeimpft und nach drei Wochen abgeerntet.

9. Untersuchungen zur Optimierung des Gehalts an Scopolamin in der Wurzelkultur

9.1. Einfluß verschiedener Medien

Aus der Arbeit mit pflanzlichen Zellkulturen ist bekannt, daß die Zusammensetzung des Mediums großen Einfluß auf die Biosynthese von Substanzen des Sekundärstoffwechsels hat (ZENK *et al.*, 1977). Für die Kulturen *H. niger* Hn und *H. desertorum* Hd wurde daher untersucht, in welchem der Medien, die unter II.3.2. aufgeführt sind, die höchsten Werte für

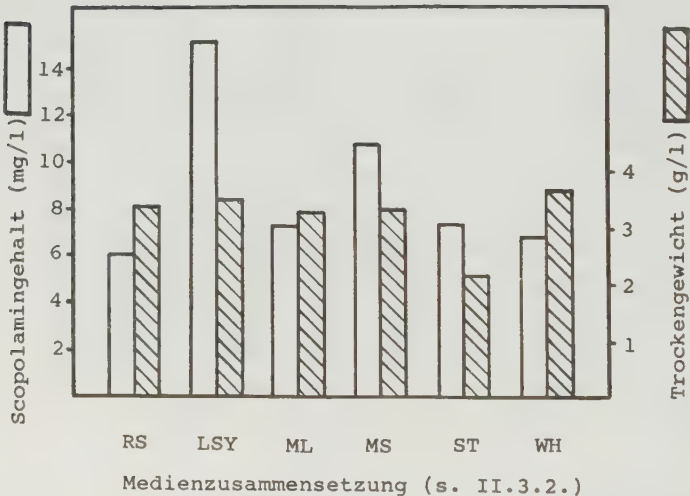


Abb. 32: Auswirkungen verschiedener Medienzusammensetzungen auf die Scopolaminbildung und das Wachstum der Wurzelkultur des *Hyoscyamus niger*-Stammes Hn. Wurzeln mit 40 mg TG in 75 ml Medium angeimpft und 21 Tage kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

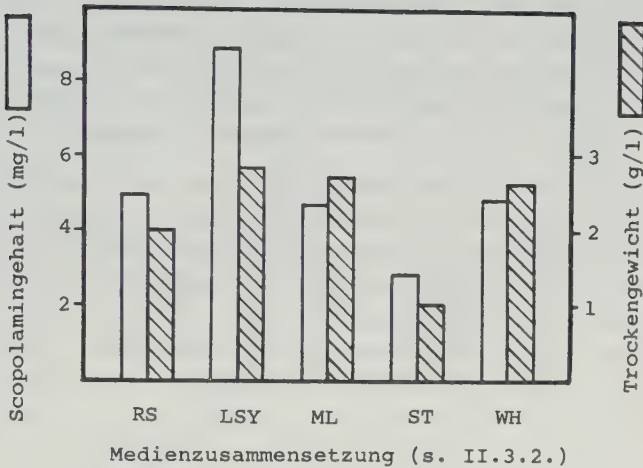


Abb. 33: Auswirkungen verschiedener Medienzusammensetzungen auf die Scopolaminbildung und das Wachstum der Wurzelkultur des *Hyoscyamus desertorum*-Stammes Hd. Wurzeln mit 40 mg TG in 75 ml Medium angeimpft und 21 Tage kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

den Scopolamingehalt gefunden wurden. Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Auswirkungen der verschiedenen Medienzusammensetzungen.

Die Ergebnisse belegten einen deutlichen Einfluß des Mediums auf das Wachstum der Kultur und die Scopolaminbildung. Die höchsten Werte im Scopolamingehalt wurden für beide Kulturen im LSY-Medium nachgewiesen. Sie betrugen 15,2 mg/l für Hn und 8,9 mg/l für Hd. Außerdem fiel auf, daß der Stamm Hn in allen Medien sowohl für die Alkaloidbildung als auch für das Wachstum höhere Werte erreichte als Hd. Eine Korrelation

zwischen dem Wachstum und der Scopolaminbildung konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. So zeigte die Kultur Hn im ST-Medium eine deutlich verringerte Trockengewichtszunahme, der Scopolamingehalt lag dagegen im Bereich der Werte, die für das RS-, ML- und WH-Medium gemessen wurden. Auch die höhere Scopolaminproduktion der Wurzeln im LSY-Medium war nicht von einer entsprechenden Änderung des Wachstums gegenüber den anderen Medien begleitet.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde der Stamm Hyoscyamus niger Hn und das LSY-Medium als Ausgangspunkt der weiteren Suche nach der bestgeeigneten Wurzelkultur und das optimale Medium für die Produktion von Scopolamin festgelegt. Es war sichergestellt, daß damit bereits von einer Kultur mit überdurchschnittlichen Eigenschaften ausgegangen wurde. Eventuelle Verbesserungen sollten daher zu Ergebnissen führen, die bei der Neuanlage von Kulturen kaum zu erwarten waren.

Als zu einem späteren Zeitpunkt der Hyoscyamin-Radioimmuntest zur Verfügung stand, wurden erneut Wurzelkulturen angelegt und in LSY-Medium angezogen. Die Ergebnisse der Alkaloidgehaltsbestimmungen zeigt die Tabelle 26. In allen untersuchten Wurzelkulturen wurden Hyoscyamin und Scopolamin nachgewiesen. Auffallend waren die hohen Hyoscyamingehalte bei Hyoscyamus albus und Hyoscyamus muticus. HASHIMOTO et al. (1986) gaben mit 1,2% (TG) einen ähnlichen Wert für Hyoscyamus albus an, bei Hyoscyamus muticus-Wurzelkulturen fanden sie dagegen nur einen Hyoscyamingehalt von 0,15% (TG).

Art	Herkunft der Samen	Alkaloidgehalt (%TG)	
		Hyoscyamin	Scopolamin
<i>Atropa belladonna</i> L.	München	0,091	0,00081
<i>Datura chlorantha</i> Hook.	Nijmegen	0,286	0,103
<i>Datura rosei</i> Safford	Poznan	0,0814	0,275
<i>Datura stramonium</i> L.	München	0,132	0,353
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Stuttgart- Hohenheim	1,73	0,193
<i>Hyoscyamus albus</i> L.	Dresden	0,433	0,246
<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	Kairo	1,20	0,272
<i>Scopolia lurida</i> Dunal	Lodz	0,0220	0,0494

Tab. 26: Wurzelkulturen von Solanaceen-Arten und ihr Gehalt an den Tropanalkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin. Kultivierung in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml LSY-Medium, Probennahme am Ende der dreiwöchigen Kulturperiode. Aufarbeitung und Gehaltsbestimmung s.II.3.5.

9.2. Einfluß von Veränderungen des Mediums

9.2.1. Auswirkungen verschiedener Saccharosekonzentrationen

Das LSY-Medium wurde mit Saccharosekonzentrationen zwischen 1% und 10% versetzt. Die Wurzeln wurden im LSY-Medium mit 3% Saccharose angezogen und in die unterschiedlichen Medien überimpft. Die Ergebnisse für Wachstum und Scopolamingehalt der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur Hn sind in Abbildung 34 dargestellt.

Der Restzuckergehalt des Mediums stieg mit der Erhöhung der Saccharosekonzentration im Medium an. Das Wachstum der Wurzeln wurde durch steigende Saccharosekonzentrationen anfangs

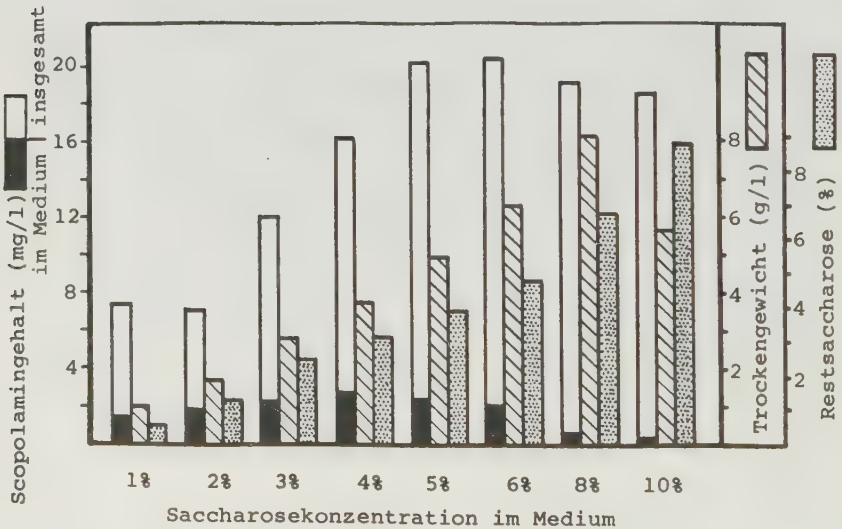


Abb. 34: Auswirkungen verschiedener Saccharosekonzentrationen im Medium auf die Scopolaminbildung und das Wachstum der Wurzelkultur des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61.

Wurzeln mit 19 mg TG in 25 ml Medium angeimpft und 21 Tage kultiviert (s. II.3). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

begünstigt, über 8% dagegen gehemmt. Die Scopolaminproduktion nahm ebenfalls zu und erreichte ihren höchsten Wert von 21 mg/l bei dem Medium mit 60 g/l Saccharose. Dies bedeutete eine Steigerung der Scopolaminbildung von 75% und des Wachstums von 130% gegenüber dem LSY-Medium mit der üblichen Saccharosekonzentration von 30 g/l. Die leichte Abnahme des Scopolamingehalts des Wurzelgewebes, ausgedrückt in Prozent vom Trockengewicht, wurde also durch die starke Zunahme des Trockengewichts (g/l) mehr als ausgeglichen.

Dieser auffallende Einfluß der Zuckerkonzentration auf die Scopolaminbildung gab Anlaß zur Untersuchung weiterer Zucker auf ihre Eignung als Ersatzstoffe für die Saccharose. Zu diesem Zweck wurden Wurzelkulturen in LSY-Medium mit 3% und 6% Glucose, Fructose, Mannit oder Sorbit sowie 2%, 4%, 6%, 8%, 10% und 12% Maltose kultiviert. Alle diese Medien waren für die Scopolaminproduktion wenig geeignet. Nur mit 3% Fructose und 6 - 12% Maltose wurde der Wert für 3% Saccharose in etwa erreicht.

9.2.2. Auswirkungen verschiedener pH-Werte

Das Basismedium für das LSY-Medium wurde von LINSMAIER und SKOOG (1965) für die Kultur pflanzlicher Zellkulturen entwickelt. Sein pH-Wert, der unkorrigiert bei 4 liegt, wird mit Natronlauge eingestellt. Der günstigste pH-Wert für die Hyoscyamus-Wurzelkultur wurde durch die Untersuchung der Wurzeln nach Wachstum bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die Wurzeln wurden im LSY-Medium, pH = 6,0, herangezogen und in Medien angeimpft, deren pH vor dem Autoklavieren auf den angegebenen Wert eingestellt worden war.

Die Ergebnisse in Abbildung 35 zeigen, daß im Bereich von pH 6 - 8 günstige Bedingungen für Wachstum und Scopolaminbildung herrschten. Für die weitere Arbeit wurde pH = 6,0 beibehalten. Dadurch wurde die Kultur keinen unnötigen Veränderungen ausgesetzt. Außerdem zeigten sich im Medium bei

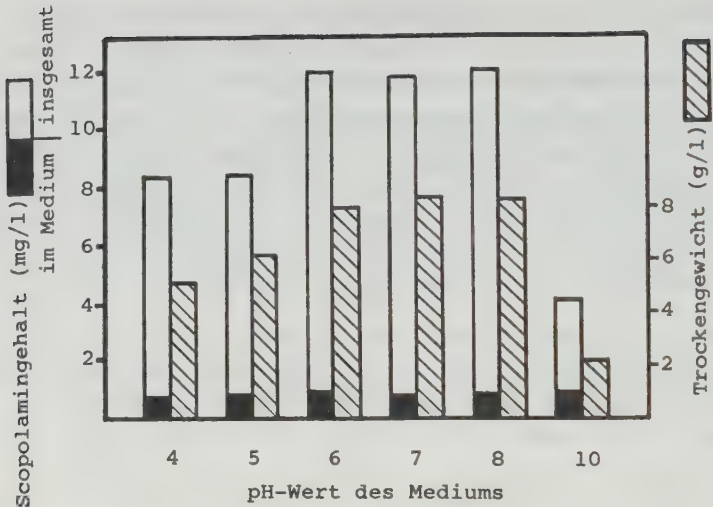


Abb. 35: Auswirkungen verschiedener pH-Werte des Mediums auf die Scopolaminbildung und das Wachstum der Wurzelkultur des *Hyoscyamus niger*-Stammes Hn 61. Wurzeln mit 50 mg TG in 50 ml LSY-Medium (6% Saccharose) angeimpft und 21 Tage kultiviert (s. II.3) Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

höheren pH-Werten ab dem Neutralpunkt feine Niederschläge nach dem Autoklavieren, die ungleichmäßige Kulturbedingungen verursachen könnten.

9.2.3. Auswirkungen von Pflanzenhormonen

Ein wichtiger Unterschied des LSY-Mediums gegenüber den übrigen verwendeten Medien (s. III.9.1.) war der Gehalt von 10^{-8} M 6-Benzyladenin, einem Phytohormon aus der Gruppe der Cytokinine. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an 6-Benzyladenin auf das Wachstum und die Scopolaminbildung

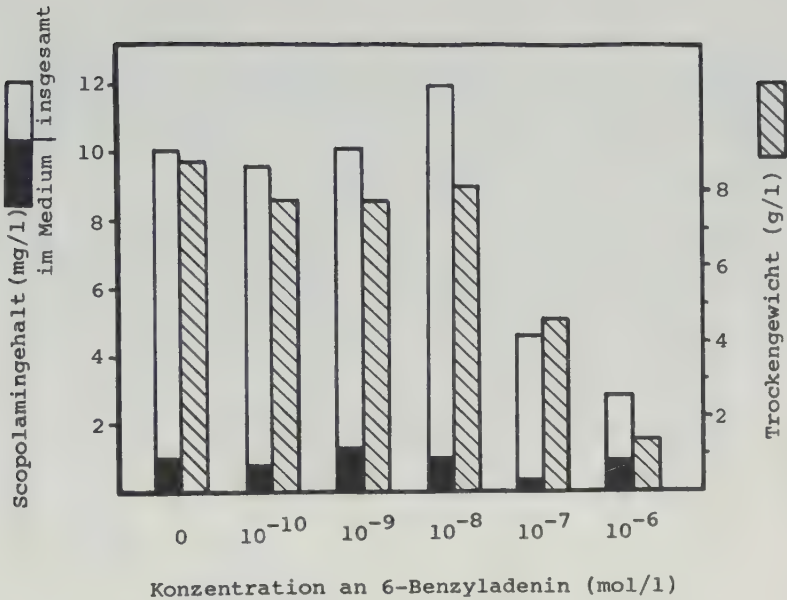


Abb. 36: Einfluß der Konzentration an 6-Benzyladenin auf Wachstum und Scopolaminbildung einer Wurzelkultur des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61 in LSY-Medium mit 60 g/l Saccharose. Wurzeln mit 50 mg TG in 50 ml Medium angeimpft und 21 Tage lang kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

wurde daher untersucht. Nach Anzucht in LSY-Medium wurden die Wurzeln unter den verschiedenen Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 36 zusammengefaßt.

Das Wachstum blieb durch 6-Benzyladeninkonzentrationen von 0 bis 10⁻⁸ mol/l nahezu unbeeinflusst, während bei 10⁻⁸ mol/l die Scopolaminproduktion ein Maximum erreichte. Diese Konzentration war im LSY-Medium enthalten. Höhere Konzentrationen führten zu einer starken Abnahme von Wachstum und Scopolaminbildung.

Der Einfluß weiterer Pflanzenwuchsstoffe wurde am Beispiel der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, einem Vertreter aus der Gruppe der Auxine, und der Giberellinsäure untersucht. Die Anzucht der Wurzeln erfolgte wieder in LSY-Medium. Die Abbildungen 37 und 38 zeigen die Ergebnisse.

Die Giberellinsäure hatte in den Konzentrationen von 0,1 - 50 mg/l keinen deutlichen Einfluß auf das Wachstum der Wurzeln. Die Scopolaminbildung wurde durch Konzentrationen von 2 mg/l und darüber verringert, während die Hyoscyaminpro-

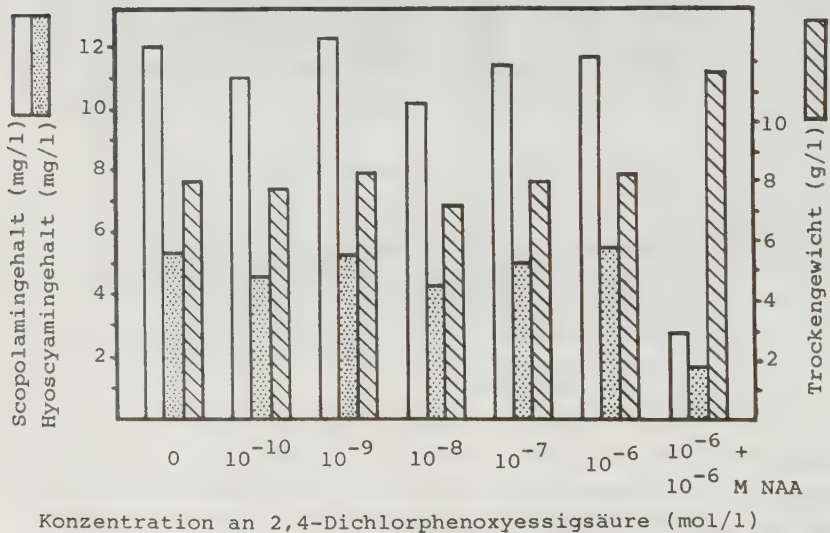


Abb. 37: Einfluß der Konzentration an 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf Wachstum und Alkaloidbildung einer Wurzelkultur des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61 in LSY-Medium mit 60 g/l Saccharose. Wurzeln mit 50 mg TG in 50 ml Medium angeimpft und 21 Tage lang kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

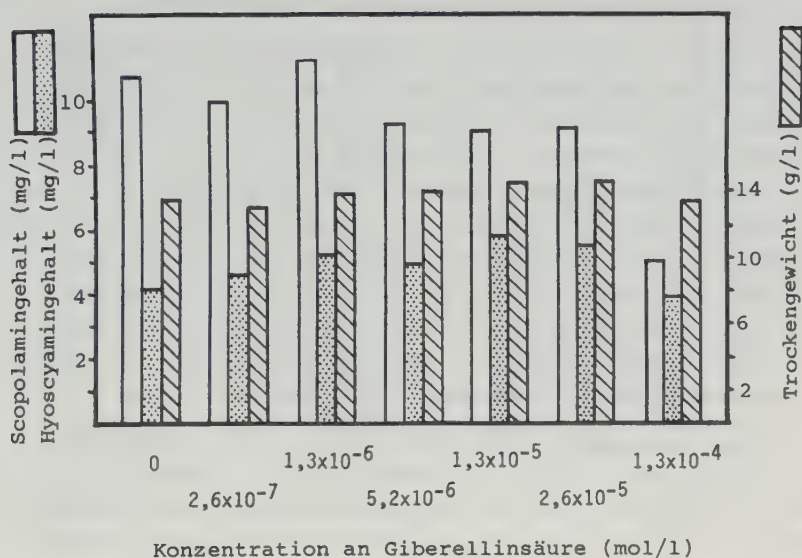


Abb. 38: Einfluß der Konzentration an Giberellinsäure A_2 auf Wachstum und Alkaloidbildung in einer Wurzelkultur des *Hyoscyamus niger*-Stammes Hn 61 in LSY-Medium mit 60 g/l Saccharose. Die Wurzeln wurden mit 33 mg TG in 25 ml Medium angeimpft und 21 Tage lang kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

duktion bei allen Konzentrationen zwischen $0,5$ und 10 mg/l leicht anstieg. Die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure bewirkte im Bereich von 10^{-10} - 10^{-6} mol/l keine Veränderungen des Wachstums und der Alkaloidproduktion. Die Kombination von 10^{-6} mol/l 2,4-D mit 10^{-6} mol/l 1-Naphtylessigsäure führte zu einem höheren Trockengewichtsgehalt bei deutlich verringertem Alkaloidgehalt. Diese Steigerung des Wachstums war von der allmählichen Zerstörung des Wurzelgewebes begleitet. Die Kultur ging in eine Suspensionskultur undifferenzierter Zellen über.

9.2.4. Auswirkungen verschiedener Alkaloidvorstufen

Der Zusatz von verschiedenen biosynthetischen Vorstufen der Tropanalkaloide wurde auf seine Wirkung auf die Scopolaminbildung hin untersucht. Die eingesetzten Substanzen waren die Aminosäuren L-Arginin, L-Asparaginsäure, L-Citrullin, L-Glutaminsäure, L-Hydroxyprolin, L-Ornithin, L-Prolin, außerdem Putrescin und Tropin. Sie wurden verschiedentlich als mögliche biosynthetische Vorstufen für die Bildung des Tropangerüsts genannt. Ebenfalls in die Versuche einbezogen wurden D,L-Tropasäure, L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Die zwei letztgenannten Stoffe können eine Rolle in der Biosynthese der Tropasäure spielen.

Für jede Substanz konnte im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-3} mol/l eine Konzentration gefunden werden, die das Wachstum der Wurzeln gegenüber dem LSY-Medium ohne Zusatz nicht verringerte. Diese Konzentrationen wurden dann verwendet, um das Medium mit Kombinationen zweier oder mehrerer der Medienzusätze zu ergänzen. Weder bei einer der erprobten Konzentrationen einer einzelnen Substanz, die Wachstum und Produktion z.T. stark hemmten, noch bei einer Kombination konnte jedoch eine erhöhte Scopolaminbildung beobachtet werden. Das Ergebnis überraschte, da solche fördernden Einflüsse auf die Bildung von Tropanalkaloiden in Wurzelkulturen wiederholt beschrieben wurden (METZ und LANG, 1964; MITRA, 1980).

Der folgende Versuch könnte eine Erklärung für diesen Sachverhalt anbieten. Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn wurden in LSY-Medium mit 3% Saccharose angeimpft, dem zum Teil Ornithin zugesetzt war. Die Anzucht der Wurzeln geschah für einen Teil des Experiments in LSY-Medium mit 3% Saccharose, für die übrigen Kolben im gleichen Medium mit 4% des Zuckers. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

Der Übergang in das Nährmedium geringeren Zuckergehalts bedeutete eine Belastung der Wurzeln. Das Wachstum und die Scopolaminproduktion nahmen ab. Der Zusatz von Ornithin konnte die Verringerung des Saccharosegehalts im Medium

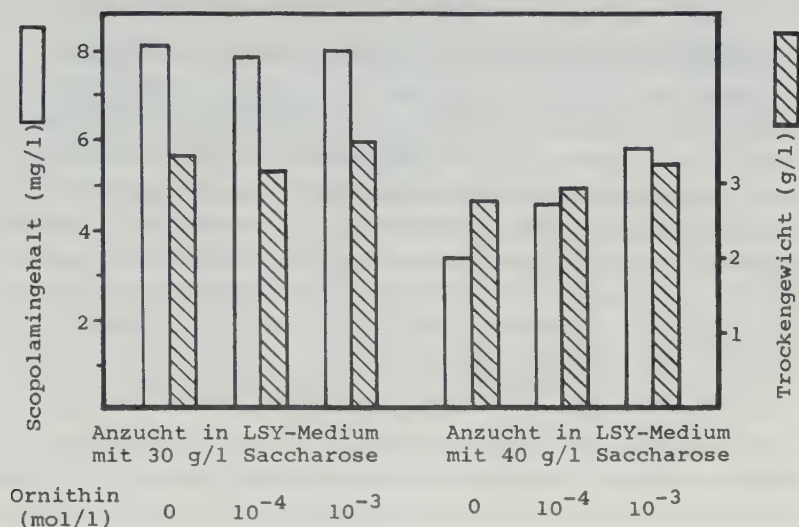


Abb. 39: Auswirkungen von Ornithin als Medienzusatz unter verschiedenen Kulturbedingungen der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur Hn 61. Die Wurzeln wurden mit 140 mg TG in 150 ml LSY-Medium angeimpft, das verschiedene Ornithin-Konzentrationen enthielt, und 21 Tage kultiviert (s. II.3.). Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

teilweise ausgleichen. Er bewirkte unter diesen Bedingungen einen höheren Trockengewichtsgehalt und vermehrte Scopolaminproduktion. Gegenüber der unveränderten Kultur bei 3% Saccharosegehalt wurde jedoch keine Steigerung erreicht. Der Ornithinanteil im Medium hatte in diesem Fall Bedeutung als Grundlage des allgemeinen Stoffwechsels. Spezifische Auswirkungen auf die Biosynthese des Scopolamins waren nicht zu erkennen.

9.3. Einfluß von Veränderungen der Kulturbedingungen

Die Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn wuchsen auch in Kulturen, die bei sonst gleichen Bedingungen nicht geschüttelt wurden, sondern unbewegt standen. Unter diesen Bedingungen breitete sich ein Wurzelgeflecht auf der Oberfläche des Mediums aus. Wegen der großen verfügbaren Oberfläche eigneten sich Penicillinkolben mit 1,5 l Medium für diese Kulturen. Nach 8 Wochen Kulturdauer in LSY-Medium (6% Saccharose) enthielten drei dieser Kolben durchschnittlich 0,93 g/l Wurzelrockgewicht und 1,1 mg/l Scopolamin (Mittelwerte aus zwei Bestimmungen). Damit waren die Ausbeuten deutlich niedriger als bei den geschüttelten Kulturen.

Außerdem wurden Kulturen untersucht, bei denen das Medium nicht durch eine Schüttelbewegung, sondern durch einen kontinuierlichen Gasstrom in Bewegung gehalten wurde. Hierzu wurde ein 5l-Erlenmeyerkolben mit 3,5 l Medium verwendet, der von einer Elektropumpe durch ein Glasrohr zentral belüftet wurde. Die Förderleistung der Pumpe wurde gerade so stark eingestellt, daß die Bewegung des Mediums ausreichte, ein Absinken der Wurzelstücke zum Boden der Kulturen zu verhindern. Sterilfilter (ACRO 50 PTFE 200 nm, Fa. Gelmann) in Zu- und Ableitung des Gasstroms verhinderten das Eindringen von Mikroorganismen. Nach dreiwöchiger Kultur mit LSY-Medium (6% Saccharose) enthielt dieser Kolben 8,9 g/l Wurzelrockgewicht, 5,5 mg/l Hyoscyamin und 8,8 mg/l Scopolamin (Mittelwerte aus vier Bestimmungen). Die Wurzeln hatten sich dann ringförmig um das Einleitungsrohr und den Gasstrom zu einem Gespinst zusammengelagert. Die Ausbeuten lagen vielfach höher als bei den statischen Kulturen ohne Belüftung. Im Vergleich zu den Kulturen auf dem Rotationsschüttler waren Wachstum und Alkaloidproduktion auch unter diesen Bedingungen zurückgegangen.

10. Selektion varianter Wurzelkulturen mit hohem Scopolamingehalt aus einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger

10.1. Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts in einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger

Die Voraussetzung für die Selektion von Kulturen mit einer bestimmten Eigenschaft ist, daß in den Teilen einer unselektionierten Ausgangskultur das erwünschte Merkmal in unterschiedlicher Ausprägung auftritt.

Die untersuchte Wurzelkultur entstand aus einem Wurzelstück der Art Hyoscyamus niger Hn, Herkunft Warschau, mit der Bezeichnung Hn 61. Nach dreimonatiger Kultur wurden der Suspensionskultur einzelne Wurzeln entnommen und halbiert. Aus dem jüngeren Teil wurde jeweils eine kleine Erhaltungskultur angelegt, der ältere Teil diente der Bestimmung des Scopolamingehaltes. Das Histogramm der Scopolamingehalte zeigt die Abbildung 40. Die Schwankungsbreite des Scopolamingehalts wurde, wie bei allen folgenden Auswertungen, durch die Standardabweichung vom Mittelwert ausgedrückt, obwohl die Häufigkeitsverteilung einer Normalverteilung nicht entsprach.

Die Auswertung ergab eine deutliche Variation der Scopolamingehalte innerhalb der Wurzelstücke. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Variation über das Ausmaß des Meßfehlers der Bestimmungsmethode hinausging, wurden die Ergebnisse von Kontrollexperimenten herangezogen. Die Schwankungsbreite der Werte im Scopolamin-Enzymimmuntest betrug im Test 5,5% und zwischen verschiedenen Tests 12% (s. III.4., Tabelle 11). Die Standardabweichung der Meßergebnisse für verschiedene Verdünnungen eines Extrakts betrug 10%, während sie bei Extrakten aliquoter Teile von einheitlichem Pflanzenmaterial mit 15% bestimmt wurde. Der Vergleich zeigte, daß die Variation des Scopolamingehalts innerhalb der Wurzelstücke signifikant größer war als der mögliche Fehler aufgrund der angesprochenen Ursachen.

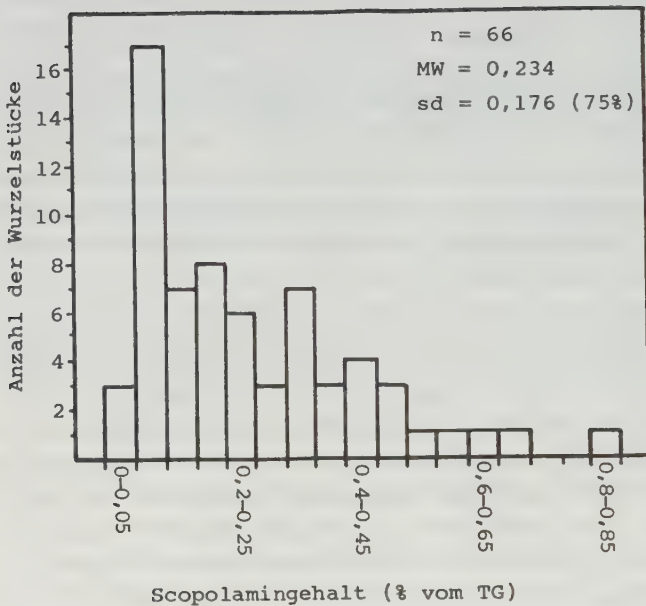


Abb. 40: Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts von einzelnen Wurzelstücken aus einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61. Die Wurzelkultur wurde in RS-Medium angezogen (Animpfgewicht 5g FG für 400 ml Medium, Kulturdauer 21 Tage). Am Ende der Kulturperiode wurden einzelne Wurzelstücke halbiert und der Scopolamingehalt des älteren Teils gemessen. Mittelwerte aus zwei Bestimmungen mit dem Scopolamin-Enzymimmuntest.

10.2. Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts in Subkulturen einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger

Für die Selektion einer Wurzelkultur mit hoher Scopolaminproduktion mußte eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Die Subkulturen aus einzelnen Teilen der Ausgangskultur mußten sich in ihrem Alkaloidgehalt unterscheiden.

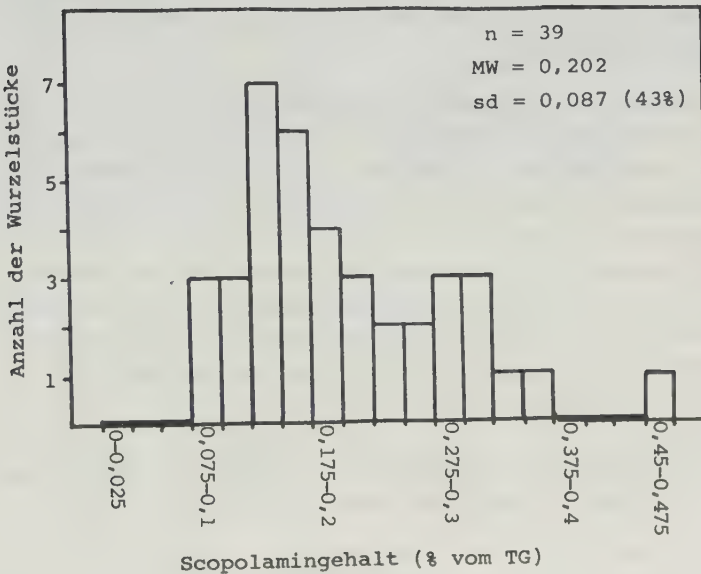


Abb. 41: Häufigkeitsverteilung des Scopolamingehalts in einer Population von Subkulturen aus der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61. 39 Subkulturen wurden aus dem zweiten Teil der in III.10.1. beschriebenen Wurzelstücke in RS-Medium angezogen. Nach 23 Tagen wurde die Hälfte der Wurzelmasse aus jeder Kultur steril entnommen und der Scopolamingehalt bestimmt. Mittelwerte aus zwei Bestimmungen im Scopolamin-Enzymimmuntest.

Von den 66 angelegten Subkulturen (s. III.10.1.) waren nach 24 Tagen 39 Stück gut angewachsen. Ungefähr die Hälfte der Wurzelmasse in jeder Kultur wurde für die Bestimmung des Scopolamingehalts entnommen. Das Histogramm in Abbildung 41 faßt die Ergebnisse zusammen.

Auch innerhalb der Subkulturen aus der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61 wurde eine Variation des Scopolamingehalts beobachtet. Sie ging über die Einflüsse der unter III.10.1. genannten Fehlermöglichkeiten des Bestimmungssystems hinaus. Die Form des Histogramms entsprach nicht einer Normalverteilung.

Vor der Neuanlage dieser 39 Kulturen war der ältere Teil jeder Ausgangswurzel unter sterilen Bedingungen abgetrennt und sein Scopolamingehalt bestimmt worden. Somit konnte dem Scopolamingehalt einer Kultur ein Wert für die Wurzel zugeordnet werden, aus der die Kultur hervorgegangen war. Es bestand jedoch keine Korrelation zwischen diesen beiden Werten. Die Untersuchung von einzelnen Wurzelstücken aus der Wurzelkultur Hn 61 war nicht geeignet, eine Wurzelkultur mit erhöhter Scopolaminproduktion zu selektionieren.

10.3. Untersuchung des Scopolamingehalts der Subkulturen von Hyoscyamus niger Hn 61 über mehrere Kulturperioden

42 Wurzelkulturen wurden aus einzelnen Wurzelstücken von Hyoscyamus niger Hn 61 angelegt und längere Zeit kultiviert. Die Bestimmung des Alkaloidgehaltes am Ende jeder Kulturperiode erlaubte den Nachweis, daß die in einer Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten gefundenen Werte miteinander korrelierten. Die Abbildung 42 zeigt diese Auswertung. Die dargestellte Korrelation konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1% als signifikant beschrieben werden.

Diese Ergebnisse bedeuteten, daß die Anlage von Subkulturen aus der Wurzelkultur Hn 61 und deren Selektion aufgrund des Alkaloidgehaltes die Möglichkeit eröffnete, eine Wurzelkul-

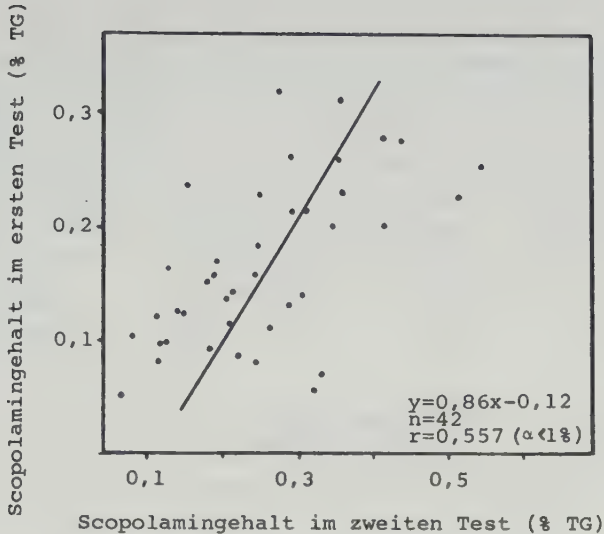


Abb. 42: Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61: Korrelation der Ergebnisse zweier Scopolamingehaltsbestimmungen an 42 Kulturen in sechswöchigem Abstand. Die Kulturen wurden aus einzelnen Wurzelstücken angelegt und über vier dreiwöchige Kulturperioden in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 50 ml RS-Medium gehalten. Am Ende der zweiten und vierten Wachstumsperiode wurde nach dem Animpfen der frischen Kolben der Scopolamingehalt der übrigen Wurzeln bestimmt. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

tur mit erhöhter Scopolaminproduktion zu etablieren. Die varianten Wurzelstämme behielten ihre Eigenschaften über mehrere Kulturperioden. Als Grundlage der Selektion mußte der Alkaloidgehalt einer Kultur am Ende der Kulturperiode, nicht der Gehalt eines Wurzelabschnitts herangezogen werden.

Aus den oben beschriebenen Wurzelstämmen von Hyoscyamus niger Hn 61 wurden Subkulturen in LSY-Medium angelegt. Die erhaltenen Suspensionskulturen wurden nach vier und sechs Kul-

turperioden auf ihren Scopolamingehalt untersucht. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 27.

Messung nach Periode	Anzahl der Kolben	Scopolamingehalt (% vom Trockengewicht)			
		Mittel- Wert	sd	Höchster Wert	Tiefster Wert
4	43	2,17	0,95	4,25	0,54
6	38	2,43	0,81	4,79	0,97

Tab. 27: Variation des Scopolamingehaltes von Wurzelkulturen des Stammes Hyoscyamus niger Hn 61. Kulturbedingungen: 400 ml LSY-Medium in 1l-Erlenmeyerkolben, andere Angaben s. II.3.4. Aufarbeitung der Wurzeln nach der vierten und sechsten Kulturperiode gemäß II.3.5. Bestimmung des Alkaloidgehaltes im Scopolamin-Enzymimmuntest. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

Wegen ihrer hohen Alkaloidgehalte im LSY-Medium zu beiden Zeitpunkten der Bestimmung wurden die Wurzelstämme Hn 61/10, Hn 61/11, Hn 61/24 und Hn 61/29 ausgewählt, daneben der Stamm Hn 61/14 wegen seines niedrigeren Scopolamingehaltes. Die Abbildung 43 zeigt den Verlauf von Wachstum und Alkaloidbildung in der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61/11 im LSY-Medium mit 6% Saccharose zum damaligen Zeitpunkt.

Die Kultur zeigte nach einer Phase geringen Wachstums von ungefähr sechs Tagen einen raschen Anstieg von Trockengewichtsgehalt und Scopolaminbildung. Dabei lag die Phase stärksten Wachstums vor dem Zeitraum der höchsten Biosyntheseaktivität für Scopolamin. Gegen Ende der Kulturperiode wurden ein Scopolamingehalt von 26 mg/l Medium und ein Trockengewicht entsprechend 12 g/l gemessen. Bei Verwendung von LSY-Medium (3% Saccharose) war das Wachstum der Kultur deutlich geringer (s.a. III.9.2.1.). Der Scopolamingehalt betrug in diesem

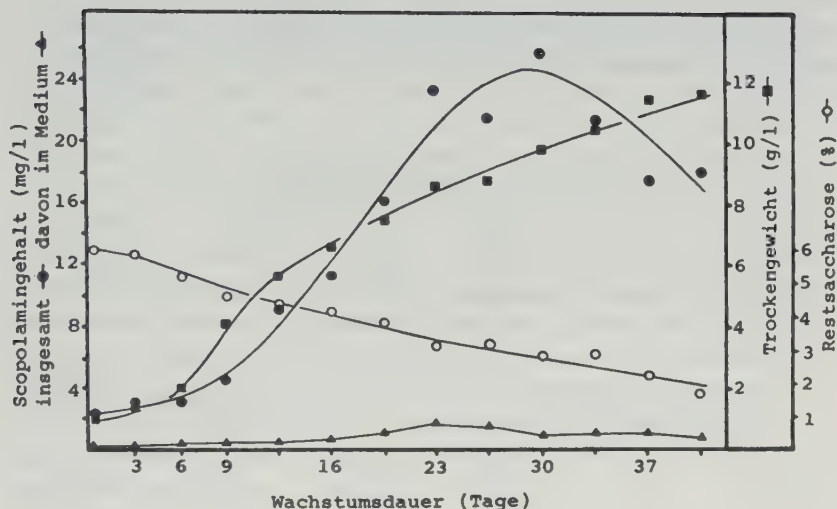


Abb. 43: Verlauf von Wachstum und Scopolaminbildung in einer Wurzelkultur von *Hyoscyamus niger* Hn 61/11. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 52 mg TG in 50 ml LSY-Medium (6% Saccharose) angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei Kolben gemäß II.3.5. aufgearbeitet und der Scopolamingehalt im Enzymimmuntest gemessen. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

Fall nach sechswöchiger Kultur nur 13 mg/l, das Trockengewicht stieg bis 4 g/l an.

Aus der Wurzelkultur Hn 61/11 wurden erneut 30 Subkulturen in LSY-Medium angelegt. Wiederum fanden sich unterschiedliche Alkaloidgehalte. Bei einem durchschnittlichen Scopolamingehalts von 2,20 mg/g Trockengewicht betrug die Standardabweichung 58% vom Mittelwert. Der Wurzelstamm Hn 61/11.2 mit einem Scopolamingehalt von 0,54% (TG) wurde für die weitere Kultur ausgewählt.

Nach mehr als eineinhalbjähriger, ununterbrochener Kultur in LSY-Medium wurden die Hn 61-Kulturen wieder auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. In Tabelle 28 werden die Ergebnisse

Mittelwerte für den Alkaloidgehalt (% TG) am Ende zweier Kulturperioden					
Stamm	im November 1984		im Juli 1986		
	Anzahl der Kolben	Gehalt an Scopolamin	Anzahl der Kolben	Gehalt an Scopolamin	Gehalt an Hyoscyamin
Hn 61/10	1	0,248	3	0,385 Min: 0,286 Max: 0,831	0,099 Min: 0,054 Max: 0,151
Hn 61/11	2	0,318	18 ¹⁾	0,452 ¹⁾ Min: 0,292 Max: 0,831	0,165 ¹⁾ Min: 0,062 Max: 0,258
Hn 61/14	1	0,128	4	0,219 Min: 0,191 Max: 0,249	0,042 Min: 0,035 Max: 0,055
Hn 61/24	1	0,300	4	0,420 Min: 0,191 Max: 0,637	0,135 Min: 0,042 Max: 0,225
Hn 61/29	1	0,306	9	0,493 Min: 0,269 Max: 0,648	0,125 Min: 0,031 Max: 0,125

Tab. 28: Alkaloidgehalte einiger selektionierter Wurzelstämme von Hyoscyamus niger Hn 61. Wurzelkulturen wurden in LSY-Medium gezogen, Bedingungen s. II.3.4. Mittelwerte der Alkaloidgehalte wurden aus den Bestimmungen nach zwei aufeinanderfolgenden Kulturperioden berechnet; jeder Einzelwert war das Ergebnis von zwei Messungen.
1) Ergebnis für Hn 61/11.2

mit früheren Meßwerten verglichen. Wie bei den Kulturen in RS-Medium ließ sich auch hier ein Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit einer Kultur zu einem Wurzelstamm und der Höhe des Scopolamingehaltes im Vergleich zu anderen Wurzelstämmen feststellen. Auf dieses Vorkommen varianter Wurzelstämmen kann der Begriff der somaklonalen Variation nach LARKIN und SNOWCROFT (1981) angewendet werden. Da alle Hn 61-Kulturen aus einem Wurzelstück und damit aus einem Samen entstanden waren, hatten sie ihren Ursprung in genetisch einheitlichem Material. Spätere Veränderungen haben sich ohne den Einfluß sexueller Vermehrungsformen ausgebildet. Momentane Unterschiede zwischen einzelnen Wurzelstämmen könnten durch somaklonale Variation ausgelöst werden, aber auch äußere Einflüsse kämen, trotz der identischen Kulturbedingungen, als Gründe in Frage. Die Wurzelstämmen behielten ihre Unterschiede jedoch über längere Zeit bei. Dafür mußten Veränderungen der Wurzeln selbst die Ursache sein.

Während der andauernden Kultivierung in LSY-Medium hatten sich die Wurzelkulturen an das Wachstum unter diesen Bedingungen adaptiert. Schon der visuelle Eindruck belegte ein stärkeres Wachstum als zu Beginn der Versuche. Die Ergebnisse der erneuten Bestimmung von Wachstum und Alkaloidbildung über eine Kulturperiode von sechs Wochen zeigt die Abbildung 44.

Bei der ursprünglichen Wurzelkultur Hn 61/11 (s. III.9.2.1. und Abbildung 43) hatte die starke Zunahme des Trockengewichtsgehalts im LSY-Medium mit 6% Saccharose zu einer gesteigerten Scopolaminproduktion geführt. Jetzt wurden im Verlauf einer sechswöchigen Kulturperiode unabhängig von der Saccharosekonzentration 35 mg/l Scopolamin erreicht. Diese Verbesserung der Wachstumseigenschaften wurde auch bei anderen Hyoscyamus niger-Wurzelkulturen beobachtet.

Aus der Wurzelkultur Hn 61/11.2 entstanden 52 Subkulturen in LSY-Medium. Nach vierwöchiger Kultivierung wurden die Gehalte an Scopolamin und Hyoscyamin für jede Kultur bestimmt.

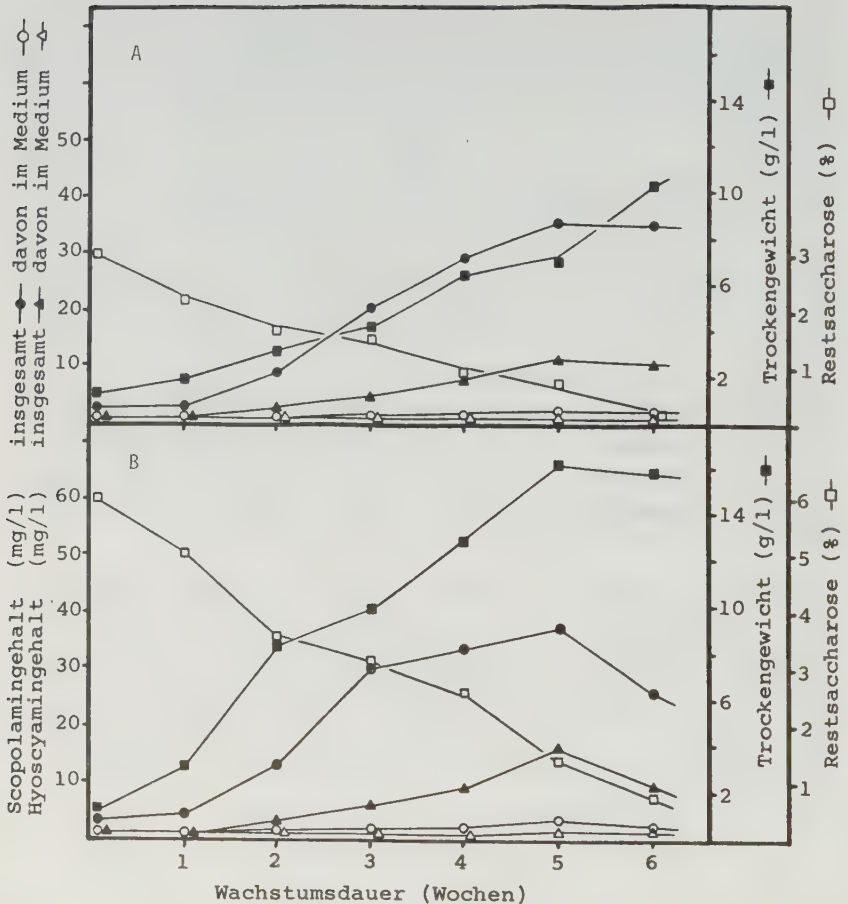


Abb. 44: Verlauf von Wachstum und Scopolaminbildung in einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61/11.2. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 66 mg TG in 50 ml LSY-Medium (A) oder LSY-Medium mit 6% Saccharose (B) angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei gleich behandelte Kolben gemäß II.3.5. aufgearbeitet und die Alkaloidgehalte im Radioimmunist gemessen. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

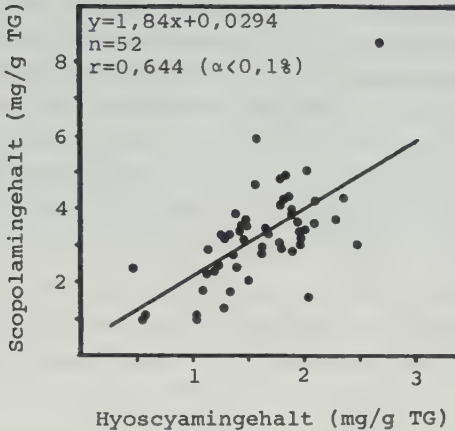


Abb. 45: Korrelation zwischen Hyoscyamingehalt und Scopolamingehalt in Wurzelkulturen von Hyoscyamus niger Hn 61/11.2. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 20 mg TG in 28 ml LSY-Medium angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Nach vierwöchiger Kultivierung betrug das mittlere Trockengewicht in den 52 Kolben 120 mg. Die Wurzeln wurden gemäß II.3.5. aufgearbeitet und die Alkaloidgehalte mit den Radioimmuntests gemessen. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

Die Abbildung 45 zeigt den Nachweis der Korrelation zwischen Hyoscyamingehalt und Scopolamingehalt. Die statistische Bewertung des errechneten Korrelationskoeffizienten (SACHS, 1984) ergab eine sehr niedrige Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha<0,1\%$). Auch die Korrelation zwischen erreichtem Trockengewicht in einer Kultur und Scopolamin- bzw. Hyoscyamingehalt wurde untersucht. Eine signifikante Abhängigkeit fand sich in diesen beiden Fällen nicht.

Zur weiteren Steigerung der Alkaloidausbeuten, bezogen auf das Medienvolumen, wurde die Erhöhung des Animpfgewichts er-

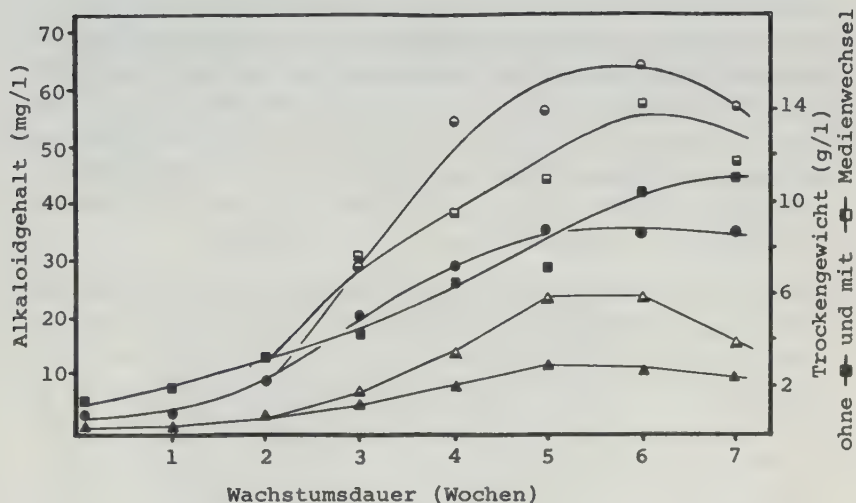
probt. Die Verdopplung des Inoculums erbrachte jedoch keine entsprechende Steigerung des Trockengewichts und der Alkaloidproduktion am Ende der Kulturperiode. Außerdem bestand bei hohen Animpfgewichten die Gefahr, daß das Wachstum der Wurzelkultur als feines Gespinst unterblieb. Immer wieder entstand ein Gemenge von einzelnen Wurzelstücken und festen Wurzelballen. Dabei kam es zu mechanischen Schädigungen durch die Schüttelbewegung und in der Folge zu geringeren Ausbeuten an Trockengewicht und Alkaloidgehalt.

Sinnvoll war dagegen der Austausch des verbrauchten Mediums nach der Ausbildung des Wurzelgespinsts und die Kultivierung über eine weitere Kulturperiode. Die Abbildung 46 zeigt den Verlauf von Wachstum und Alkaloidproduktion unter diesen Bedingungen.

Durch den Medienwechsel stieg das Trockengewicht von 10 g/l auf 14 g/l, bezogen auf die Medienmenge im Kolben. Die Scopolaminproduktion stieg gleichzeitig von 35 mg/l auf 65 mg/l, die Hyoscyaminproduktion von 12 mg/l auf 24 mg/l. Unter Berücksichtigung des Mediums für die erste Kulturphase blieb die Alkaloidausbeute pro 1 Medium ungefähr gleich. Durch den Medienwechsel konnte jedoch die benötigte Stellfläche auf dem Schüttler und die Zahl der notwendigen Kolben um die Hälfte reduziert werden. Außerdem verringerte sich der Arbeitsaufwand, da statt der Neuanlage der Kulturen nur ein Medienwechsel anfiel. Für eine beabsichtigte Isolierung der Alkaloide wäre auch die höhere Konzentration im Wurzelgewebe von Vorteil.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß sich die Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61 und ihre Subkulturen über einen Zeitraum von nahezu drei Jahren kultivieren ließen. Dabei deutete kein Anzeichen auf eine begrenzte Lebensdauer dieser Kulturen unter den beschriebenen Bedingungen hin. Auch ihre Fähigkeit zur Biosynthese von Hyoscyamin und Scopolamin blieb in diesem Zeitraum erhalten. Die zu beobachtende Variation wurde zur Selektion hochproduzierender

Wurzelstämme genutzt. Während des Untersuchungszeitraums konnte eine Alkaloidproduktion von 24 mg/ml Hyoscyamin und 65 mg/l Scopolamin erreicht werden. Die Kultur benötigte dazu eine Wachstumsperiode von sechs Wochen, die einen einmaligen Medienwechsel nach zwei Wochen einschloß.



Scopolamingehalt (mg/l) ohne —●— und mit —○— Medienwechsel
 Hyoscyamingehalt (mg/l) ohne —▲— und mit —△— Medienwechsel

Abb. 46: Verlauf von Wachstum und Alkaloidbildung in einer Wurzelkultur von *Hyoscyamus niger* Hn 61/11.2. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 66 mg TG in 50 ml LSY-Medium angeimpft. Nach zwei Wochen wurde bei einem Teil der Kolben das Medium gegen 50 ml frisches LSY-Medium ausgetauscht. Kulturbedingungen s. II.3.4. Zu jedem Zeitpunkt wurden zwei gleich behandelte Kolben gemäß II.3.5. aufgearbeitet und die Alkaloidgehalte gemessen. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

11. Untersuchung der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61 auf Hinweise für eine Transformation durch Agrobacterium rhizogenes

Die Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61 zeichnete sich durch rasches Wachstum und die Ausbildung stark verzweigter, fein behaarter Einzelwurzeln aus. Diese Eigenschaften werden allgemein den Wurzelkulturen zugeschrieben, die nach der Transformation pflanzlicher Zellen durch Agrobacterium rhizogenes entstehen (TEPFER, 1984; anschauliche photographische Darstellung einer Wurzelkultur bei TANAKA et al., 1985). Um zu klären, ob die Kulturen zufällig von einer durch Agrobacterium rhizogenes veränderten Pflanze stammten, wurde Wurzelmaterial der Kulturen Hn 61/10, Hn 61/11.2 und Hn 61/29 auf einen möglichen Gehalt an Opinen untersucht.

Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen, in 0,1 N HCl bei 100°C 5 min extrahiert und abzentrifugiert. Der Trockenrückstand des Überstands wurde in H₂O (0,2 ml/g Frischgewicht) aufgenommen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Celluloseplatten (Fa. Merck), als Laufmittel fand Ethanol 80% Verwendung (TANAKA et al., 1985). Zur Detektion wurde mit Silbernitratlösung (20 mg/ml in Aceton/H₂O 90/2) und nach dem Trocknen mit Natriumhydroxidlösung (20 mg/ml in Ethanol 90%) besprüht.

Da für diese Arbeit authentische Referenzsubstanzen verschiedener Opine nicht zur Verfügung standen, wurde das Ergebnis überprüft durch die papierchromatographische Untersuchung der Wurzelextrakte im Laboratorium von Prof. Tempe, Orsay, Frankreich. Frau Dr. A. Petit sei für die Durchführung dieser Arbeiten herzlich gedankt. Die Methodik wurde am dortigen Institut entwickelt (PETIT et al., 1970; 1983). Als Referenzsubstanzen dienten Agropin, Mannopin und Agropinsäure.

Beide Untersuchungsmethoden ergaben die Abwesenheit der überprüften Opine. Damit konnte für die Wurzelkultur Hyoscyamus

niger Hn 61 keine Transformation durch Agrobacterium rhizogenes nachgewiesen werden.

TEPPER (1984) nannte als phenotypische Merkmale einer Pflanze nach Transformation durch Agrobacterium rhizogenes das verringerte Längenwachstum des Sprosses, die Zunahme der Blattbreite im Verhältnis zur Länge und die faltige Ausbildung der Blätter. Zur Überprüfung wurden aus einigen Samen der gleichen Herkunft wie Hyoscyamus niger Hn 61 Pflanzen im Gewächshaus angezogen. Sie zeigten ein normales Längenwachstum und keinerlei Auffälligkeiten im Aussehen ihrer Blätter (s. Abbildung 47).



Abb. 47: Pflanze von Hyoscyamus niger Hn.
(Anzucht im Gewächshaus, Alter vier Monate)

12. Untersuchungen zum Alkaloidgehalt in einzelnen Wurzeln der Kultur Hyoscyamus niger Hn 61/11.2

Bei der Beobachtung von Wachstum und Alkaloidgehalt in einer Wurzelkultur über eine ganze Kulturperiode zeigte sich, daß Wachstum und Synthese von Hyoscyamin und Scopolamin nicht gleichzeitig verlaufen (vgl. III.10., Abbildungen 43, 44). Die Phase stärksten Wachstums lag vor dem Zeitraum mit der größten Zunahme des Scopolamingehalts. Das Verhältnis von Scopolamin zu Hyoscyamin stieg in der ersten Hälfte der Kulturperiode an und erreichte gegen Ende wieder den Anfangswert.

Die Abbildungen 48 und 49 zeigen eine Wurzelkultur zu zwei Zeitpunkten der Kultivierung. Nach dem Animpfen schwebten die Wurzelbruchstücke unabhängig voneinander im Medium. In den ersten 7 - 9 Tagen wuchsen die Wurzeln, ohne sich neu zu verzweigen. Die Seitenwurzeln bildeten sich während der nächsten Woche aus. Diese verzweigten Wurzeln vereinigten sich zu einem immer dichter werdenden Gespinst. Zu sekundären Verzweigungen kam es nicht. Erst nach dem Zerteilen des Wurzelgespinstes und dem Animpfen in eine neue Kultur waren auch die bisherigen Seitenwurzeln in der Lage, sich zu verzweigen. Zu untersuchen war nun, ob während einer Kulturperiode regelmäßige Veränderungen bei der Verteilung der Alkaloide in den Einzelwurzeln einer Kultur zu beobachten waren.

12.1. Vergleich von Alkaloidgehalten in der Hauptwurzel und ihren Verzweigungen

Die Abbildung 50 zeigt die Veränderungen der Alkaloidgehalte in den Hauptwurzeln und den dazugehörigen Seitenwurzeln im Laufe einer Kulturperiode.

Zu jedem Zeitpunkt war der Alkaloidgehalt der Hauptwurzel höher als in den Seitenwurzeln. Besonders beim Scopolamin-

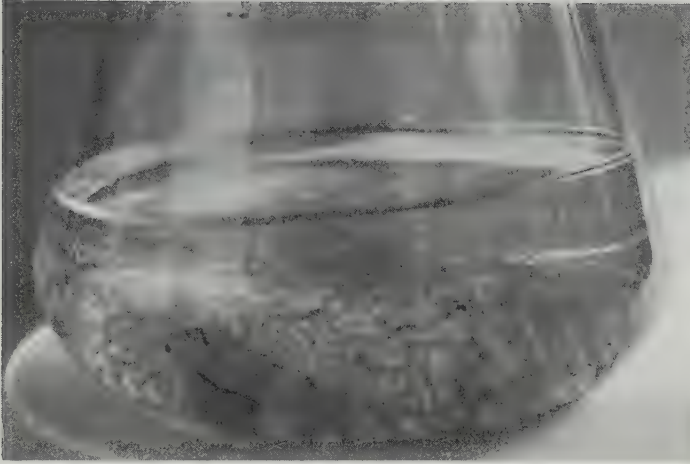


Abb. 48: Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61/11 nach sechstägiger Kultivierung in LSY-Medium.

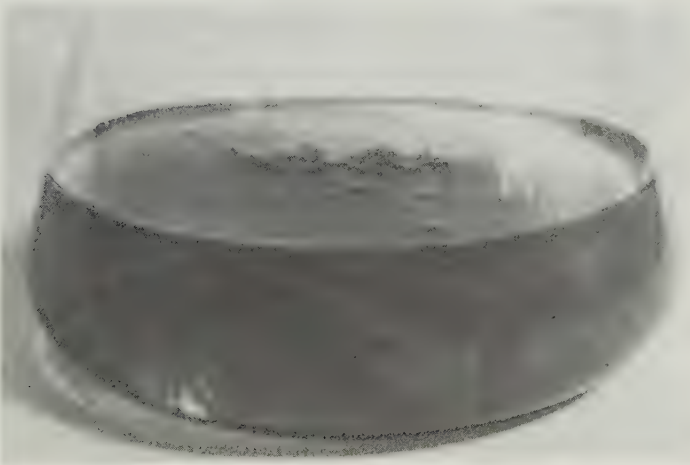


Abb. 49: Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61/11 nach siebzehntägiger Kultivierung in LSY-Medium.

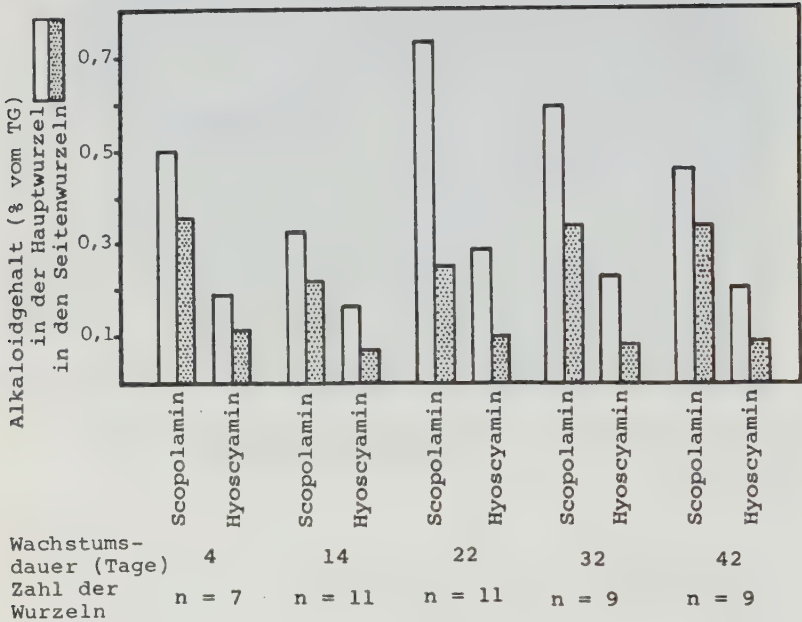


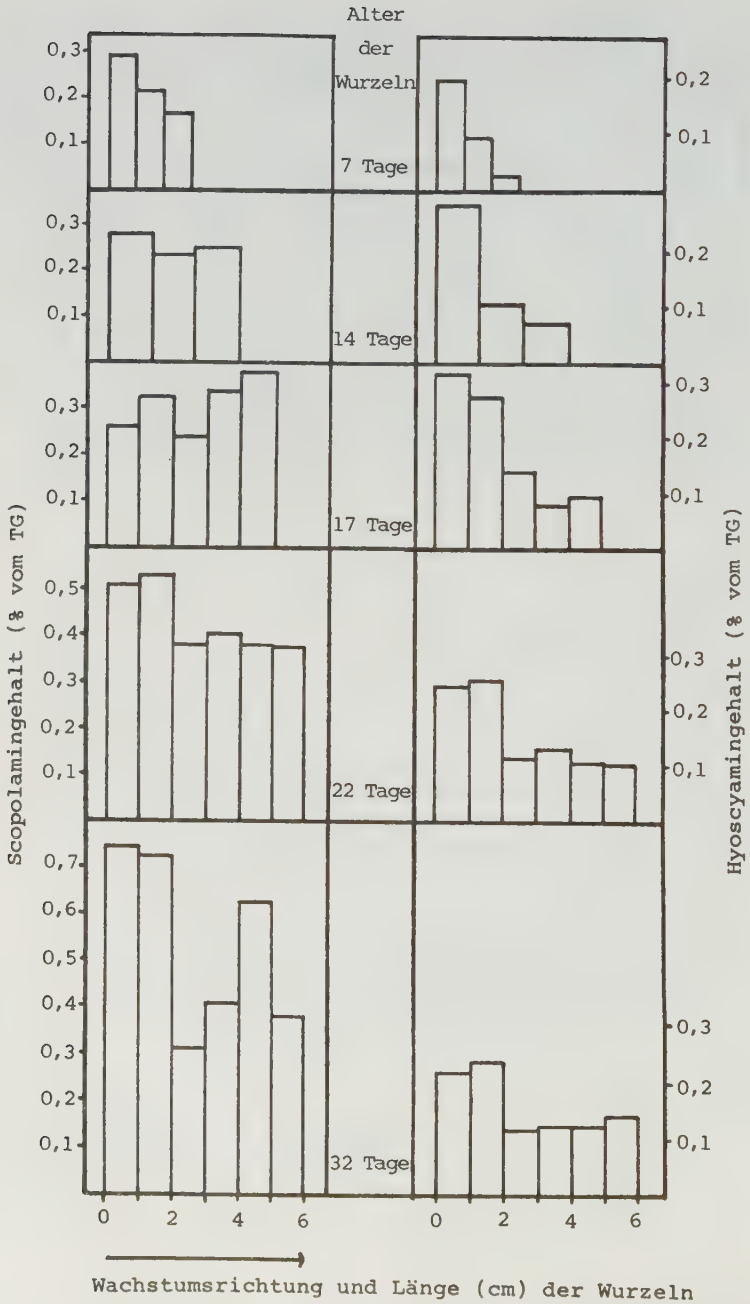
Abb. 50: Beziehungen zwischen Hyoscyamin- und Scopolamin-gehalt von Haupt- und Seitenwurzeln während der Kultivierung von Hyoscyamus niger Hn 61/11. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 130 mg TG in 400 ml LSY-Medium angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Nach den angegebenen Zeiträumen wurde je ein Kolben nach III.3.5. aufgearbeitet. Von den abfiltrierten Wurzeln wurden sofort n Stück mit einem Skalpell zerlegt. Nach zweimaliger Alkaloidgehaltsbestimmung für die einzelnen Teile wurden Mittelwerte gebildet.

gehalt ließen sich Veränderungen im Laufe der Kultur beobachten. Vier Tage nach dem Animpfen der Kultur lag der Scopolamingehalt für Haupt- und Seitenwurzeln nah beieinander, die relativ hohen Werte spiegelten wohl die Verhältnisse in der vorherigen Kultur wieder. Neugebildete Verzweigungen wurden jetzt noch nicht beobachtet. In der Phase der stärksten Trockengewichtszunahme nahm der Scopolamingehalt stark ab. Nach drei Wochen war dann der Scopolamingehalt der Hauptwurzeln stark angestiegen, in den Seitenwurzeln dagegen noch relativ niedrig. Zu diesem Zeitpunkt waren die Seitenwurzeln als Neubildungen dieser Kulturperiode anzusehen. In der Folgezeit näherten sich die Scopolamingehalte einander wieder an. Die Veränderungen des Hyoscyamingehalts folgten diesem Verlauf. Sie waren jedoch weniger stark ausgeprägt. Dadurch stieg das Verhältnis von Scopolamin zu Hyoscyamin an.

12.2. Untersuchung der Alkaloidverteilung entlang der Längsachse der Wurzeln

Während einer Kulturperiode nahm die Länge der einzelnen Wurzeln von 1-2 cm auf 5-7 cm zu. Sie wiesen dabei mit einem hellen, wachsenden Teil und einem bräunlichen, älteren Teil eine eindeutige Polarität auf. Das Ergebnis der abschnittsweisen Untersuchung des Alkaloidgehaltes der Wurzeln ist in Abbildung 51 dargestellt.

Abb. 51: Veränderungen der Alkaloidverteilung entlang der Längsachse der Wurzeln im Laufe der Kultivierung von Hyoscyamus niger Hn 61/11. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 130 mg TG in 400 ml LSY-Medium angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Nach 7 Tagen, 14 Tagen, 17 Tagen, 22 Tagen und 32 Tagen wurde je ein Kolben nach III.3.5. aufgearbeitet. Von den abfiltrierten Wurzeln wurden sofort 10 Stück mit einem Skalpell zerlegt. Die Alkaloidgehalte der einzelnen Teile wurden in den Radioimmuntests gemessen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte für 10 untersuchte Wurzeln pro Zeitpunkt nach zweimaliger Bestimmung des Alkaloidgehalts in jedem Teil.



Beim Hyoscyamingehalt war während des gesamten beobachteten Zeitraums ein deutliches Gefälle entlang der Längsachse der Wurzeln zu beobachten. Die höheren Werte waren stets im ältesten Teil der Wurzel anzufinden. Das Verhältnis aus höchstem und niedrigsten Gehalt nimmt im Laufe der Kultivierung etwas ab.

Beim Scopolamingehalt fanden sich zu Beginn und gegen Ende der Kultivierung ebenfalls höhere Werte in den älteren Teilen der Wurzeln. In der Phase der stärksten Scopolaminbildung waren diese Unterschiede jedoch aufgehoben. Verursacht wurde dies durch den Rückgang des Scopolamingehalts im älteren Teil der Wurzeln im ersten Teil der Kultivierungsperiode.

Während der Phase der stärksten Scopolaminbildung fand sich gleichzeitig eine auffallende Konzentration von Alkaloiden in der Wurzelspitze. Die Abbildung 52 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von 1,5 mm langen Abschnitten von einzelnen Wurzeln. Der Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin war in der Spitze wesentlich höher als in den folgenden Teilen. Bei vergleichbaren Messungen an älteren Kulturen (22 Tage und 32 Tage Kulturdauer) wurden dagegen gleichmäßige Alkaloidgehalte in den entsprechenden Abschnitten der Wurzeln gemessen, ohne daß eine erhöhte Konzentration in der Wurzelspitze festgestellt wurde.

Die Untersuchungen zum Alkaloidgehalt einzelner Wurzeln aus der Kultur von Hyoscyamus niger Hn 61/11 zeigten, daß seine Veränderungen nicht gleichmäßig in allen Teilen der Einzelwurzeln erfolgten. Dadurch ergaben sich Veränderungen im Alkaloidgehalt der einzelnen Teile und wechselnde Verhältnisse zwischen Hyoscyamin und Scopolamin. Diese überlagerten sich den Effekten, die durch den zeitlichen Abstand von Wachstum und Alkaloidproduktion der gesamten Kultur hervorgerufen wurden.

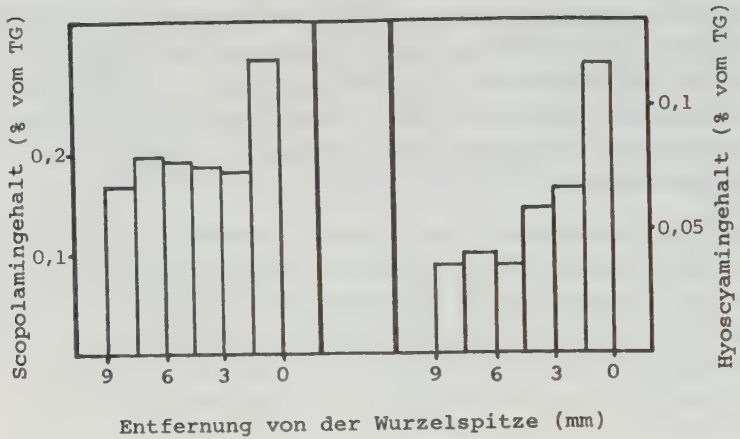


Abb. 52: Alkaloidverteilung in der Spitze der Wurzeln aus der Kultur von *Hyoscyamus niger* Hn 61/11. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 130 mg TG in 400 ml LSY-Medium angeimpft. Kulturbedingungen s. II.3.4. Nach 14 Tagen wurde ein Kolben nach III.3.5. aufgearbeitet. Von den abfiltrierten Wurzeln wurden sofort 10 Stück mit einem Skalpell zerlegt. Homologe Teile wurden vereinigt, um wägbare Trockengewichte zu erhalten, und die Alkaloidgehalte mittels der Radioimmuntests gemessen. Mittelwerte von zwei Bestimmungen.

13. Untersuchung der Biokonversion zugesetzter Tropanalkaloide durch eine Wurzelkultur von Hyoscyamus niger

13.1. Biotransformation der Alkaloide Hyoscyamin, Atropin, 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Dehydrohyoscyamin

Durch die Auswahl geeigneten Samenmaterials und günstiger Kultivierungsbedingungen konnte eine Hyoscyamus niger-Wurzelkultur etabliert werden, die zur Biosynthese der Tropanalkaloide in nennenswerten Mengen fähig war. Ihr Scopolamingehalt betrug 0,5% vom Trockengewicht. Neben dieser völligen Neusynthese könnte die Kultur eine weitere Möglichkeit bieten, Scopolamin zu produzieren. Höhere Ausbeuten sind eventuell möglich, wenn Vorstufen appliziert und die Fähigkeit der Wurzelkultur zur Biotransformation ausgenutzt werden kann.

Um die Auswirkungen auf die Wurzelkultur zu untersuchen, wurden die Alkaloide dem Medium nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61/11 wurden in LSY-Medium angezogen und in die Kolben mit den unterschiedlichen Alkaloidzusätzen angeimpft. Nach dreiwöchiger Kultur erfolgte die Bestimmung von Wachstum und Alkaloidgehalt. Für die Messung des Hyoscyamingehaltes nach Zusatz von Atropin wurde das Serum 160A wegen seiner Spezifität für L-Hyoscyamin verwendet. Beim Hyoscyamin-Radioimmunttest der übrigen Proben kam Serum 188A wegen der noch geringeren Kreuzreaktivität mit Dehydrohyoscyamin und 6 β -Hydroxyhyoscyamin zum Einsatz. Für die Beurteilung der Fähigkeit zur Biotransformation wurde die Umwandlungsrate für jedes zugefügte Alkaloid berechnet. Sie ergab sich aus dem Verhältnis der Zunahme an Scopolamin (in mol) gegenüber der Kultur in unverändertem LSY-Medium und der eingesetzten Alkaloidmenge (in mol). Die Wiederfindung an Hyoscyamin berechnete sich als Quotient der Zunahme des Hyoscyamingehalts und der eingesetzten Hyoscyaminmenge. Die Werte finden sich in Tabelle 29.

Zugege- benes Alkaloid	Wieder- finder- rate ¹⁾	TG (g/l)	Hyoscyamingehalt Medium (mg/l)	Wurzeln (mg/l)	Scopolamingehalt Medium (mg/l)	Wurzeln (mg/l)	Umsatz ²⁾ zu Sco- polamin
--	--	2,7	0,1	3,4	4,0	13	--
Atropin 2 mmol/l	60%	3,8	17	16	28	12	4,1%
Hyoscyamin 1 mmol/l	57%	3,1	18	15	19	13	4,9%
Dehydro- Hyoscyamin 1 mmol/l	-- ³⁾	2,7	0,9	9,8	59	28	22,5%
6 β -Hydroxy- hyoscyamin 1 mmol/l	-- ³⁾	2,8	0,3	5,8	3,8	29	5,1%

Tab. 29: Biokonversion verschiedener Tropanalkaloide in der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61. Die Wurzeln wurden mit 18 mg TG in 25 ml LSY-Medium angeimpft und 21 Tage kultiviert. Kulturbedingungen und Aufarbeitung nach II.3. Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

- 1) molares Verhältnis der Zunahme an L-Hyoscyamin gegenüber der Kontrolle und der zugegebenen Menge L-Hyoscyamin
- 2) molares Verhältnis der Zunahme an Scopolamin gegenüber der Kontrolle und dem eingesetzten Alkaloid
- 3) Alkaloid war dünnschichtchromatographisch noch nachweisbar

Am Ende der Kultivierungsdauer befanden sich fast 90% des gesamten Hyoscyamins in einem Kolben im Wurzelextrakt. Da die zugesetzten Mengen an Alkaloid das Mehrfache der in den Kontrollkolben gefundenen Hyoscyaminmenge betrug, muß ein großer Teil des zugesetzten Hyoscyamins von den Wurzeln aufgenommen worden sein. Durch dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte (vgl. III.8.) wurde auch für Dehydrohyoscyamin und 6 β -Hydroxyhyoscyamin nachgewiesen, daß sich ein großer Teil der Alkaloide in den Wurzeln befand.

Bei der Bestimmung der Umbauraten mußte berücksichtigt werden, daß wegen der - wenn auch geringen - Kreuzreaktivitäten schon die eingesetzten Alkaloide in unveränderter Form kleine Umbauraten vortäuschten. Diese wurden an Kontrollkolben bestimmt, die Medium und zugesetztes Alkaloid enthielten, jedoch kein Wurzelgewebe. Die Kreuzreaktivitäten im Scopolamin-Enzymimmuntest betrugen 0,5% für Dehydrohyoscyamin, 2,3% für 6 β -Hydroxyhyoscyamin und weniger als 0,03% für Hyoscyamin bzw. Atropin.

Wurde Dehydrohyoscyamin zugesetzt, stieg die Produktion an Scopolamin deutlich an. Die Umwandlung in Scopolamin erreichte 22,5%. Denkbar wäre auch, daß Dehydrohyoscyamin lediglich die Scopolaminbiosynthese in der Wurzelkultur angeregt hätte, ohne selbst Substrat der Reaktion zu sein. Wahrscheinlicher ist jedoch seine Biokonversion zu Scopolamin, wie es FODOR et al. (1959) an alkaloidfreien Trieben von Datura beobachtet hatten.

Nach Applikation von Atropin oder Hyoscyamin wurde ein geringerer Anstieg der Scopolaminbildung gemessen. Die Umwandlungsrate betrug 4,9% für L-Hyoscyamin. Mit 4,1% erreichte der Wert für Atropin weit mehr als die Hälfte der Umwandlungsrate bei L-Hyoscyamin. Dennoch sollte daraus nicht auf die Biotransformation von D-Hyoscyamin zu Scopolamin geschlossen werden. Die Ursache hierfür war eher die wachstumsfördernde Wirkung, die Atropin in stärkerem Maß als Hyoscyamin auf die Wurzelkulturen ausübte. Dies deutete

ebenso wie die niedrigen Wiederfinderaten für Hyoscyamin darauf hin, daß ein Teil der zugesetzten Alkaloide für den Grundstoffwechsel der Zellen genutzt wurde. Gestützt wurde dieser Befund auch durch die Beobachtungen an Kolben, die nur Medium und Hyoscyamin enthielten. Hier war nach der Kultivierungsdauer von drei Wochen die eingesetzte Alkaloidmenge noch enthalten.

6 β -Hydroxyhyoscyamin führte in der Wurzelkultur zu einer Steigerung der Scopolaminbildung, nicht zu verstärktem Wachstum. Die Umwandlungsrate betrug 5,1%.

13.2. Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin in der Wurzelkultur des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61

Durch die Versuche zur in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin sollten diejenigen Stoffe erkannt werden, die in der Wurzelkultur Hn 61 aus Hyoscyamin entstehen. Die Synthese des radioaktiv markierten Alkaloids wurde unter III.1. beschrieben.

Für diese Versuche wurden die Wurzeln in LSY-Medium angezogen und mit 1 g TG/l in LSY-Medium mit 6% Saccharose angeimpft. Nach 10 Tagen, am Ende der Phase des stärksten Zuwachses an Wurzelmasse, wurden 26 kBq (0,7 μCi) ^{14}C -Hyoscyamin, gelöst in 10 μl Methanol, zur Kultur gegeben. Nach der angegebenen Kultivierungsdauer wurden die Kolben nach der Vorschrift unter II.3.5. aufgearbeitet. Die Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse eines Versuchs mit unterschiedlichen Zeiträumen für die Biotransformation, dessen wesentliche Resul-

Tab. 30: In vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61.
Die Wurzeln wurden mit 24 mg TG in 25 ml LSY-Medium (6% Saccharose) angeimpft und nach 10 Tagen mit ^{14}C -Hyoscyamin versetzt. Aufarbeitung gemäß II.3.5. nach der angegebenen Zeit.

Zeitraum für die Biotransformation

	1 Tag	2 Tage	4 Tage	7 Tage
Eingesetzte Radioaktivität	25,6 kBq = 100%	25,6 kBq = 100%	25,6 kBq = 100%	29,4 kBq = 100%
Wiedergefundene Radioaktivität	23,5 kBq = 92 %	22,4 kBq = 88 %	22,3 kBq = 87 %	28,3 kBq = 96 %
in den Wurzeln	17,8 kBq = 69 %	18,0 kBq = 70 %	18,5 kBq = 72 %	24,8 kBq = 84 %
als Hyoscyamin	11,2 kBq = 44 %	9,9 kBq = 39 %	7,4 kBq = 29 %	4,2 kBq = 14 %
als Scopolamin	4,9 kBq = 19 %	7,0 kBq = 27 %	9,9 kBq = 39 %	16,9 kBq = 57 %
als 6 β -Hydroxyhyoscyamin	1,6 kBq = 6,2%	1,0 kBq = 3,9%	0,6 kBq = 2,3%	2,2 kBq = 7,5%
im Medium	5,7 kBq = 22 %	4,4 kBq = 17 %	3,8 kBq = 15 %	3,5 kBq = 12 %
als Hyoscyamin	3,9 kBq = 15 %	2,6 kBq = 10 %	960 Bq = 3,7%	410 Bq = 1,4%
als Scopolamin	1,1 kBq = 4,3%	1,6 kBq = 6,3%	2,6 kBq = 10 %	3,0 kBq = 10 %
als 6 β -Hydroxyhyoscyamin	260 Bq = 1,0%	150 Bq = 0,5%	70 Bq = 0,3%	200 Bq = 0,7%

Bilanz der Biotransformation

unverändert als Hyoscyamin	15,1 kBq = 59 %	12,5 kBq = 49 %	8,3 kBq = 33 %	4,6 kBq = 16 %
umgewandelt zu Scopolamin	6,0 kBq = 23 %	8,6 kBq = 34 %	12,4 kBq = 49 %	19,9 kBq = 67 %
umgewandelt zu 6 β -Hydroxyhyoscyamin	1,9 kBq = 7,4%	1,2 kBq = 4,5%	0,6 kBq = 2,5%	2,4 kBq = 8,2%
unbekannte Produkte	0,5 kBq = 2,0%	250 Bq = 1,0%	1,0 kBq = 3,8%	1,7 kBq = 5,7%
Fehler/nicht erfaßte Radioaktivität	8,2%	12 %	13 %	4,5%

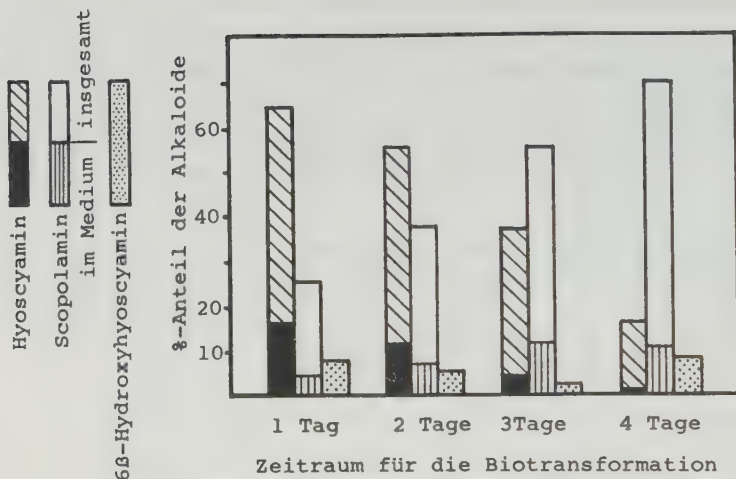


Abb. 53: In vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61. Für Angaben zum Experiment siehe die Legende der Tabelle 30. Die Prozentangaben beziehen sich auf die gesamte wiedergefundene Radioaktivität.

tate in der Abbildung 53 zusammengefaßt wurden. Ein großer Teil der eingesetzten Radioaktivität, bis zu 67%, fand sich in Scopolamin wieder. Dies zeigte die Vorteile des beschriebenen Vorgehens für die Biotransformationsversuche. In Experimenten an ganzen Pflanzen werden häufig sehr viel niedrigere Einbauraten erzielt. Deshalb mußten schon Werte unter 0,5%, herunter bis 0,03%, als Beweis für einen Biosyntheseweg herangezogen werden (LEETE und LUCAST, 1976; LUANRATANA und GRIFFIN, 1982).

Die Alkaloide Hyoscyamin, 6β-Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin wurden durch die Lage der Schwärzungen auf den Autoradiographien und der Substanzflecken für die Alkaloide nach der Chromatographie in den Laufmitteln 2,3,7,8 und 9 sowie

nach der zweidimensionalen Chromatographie in den Laufmitteln 2 und 4 vorläufig identifiziert. Für diese Versuche wurden die Lösungen der radioaktiv markierten Produkte und die Lösungen der Referenzalkaloide gemeinsam am Startpunkt der Chromatographie aufgetragen. Die Detektion der Referenzalkaloide erfolgte visuell nach Besprühen mit Dragendorffs Reagens. Die Autoradiogramme wurden nach der Vorschrift unter II.3.5. hergestellt.

Für Hyoscyamin und Scopolamin war die Lage von Schwärzungen und Substanzflecken stets völlig deckungsgleich. Das Vorliegen von Hyoscyamin war damit aufgrund seines synthetischen Ursprungs und des zeitlichen Verlaufs seines Auftretens gesichert. Das Produkt Scopolamin wurde unter Verwendung des spezifischen Scopolamin-Enzymimmuntests auf folgende Weise bestätigt. Verwendet wurde dafür ein Aliquot des Extrakts nach 7 Tagen Kulturdauer mit ^{14}C -Hyoscyamin (s. Tabelle 30), entsprechend 1,1 kBq (= 30 nCi). Nach Entwicklung in Laufmittel 2 wurde das Chromatogramm in 8 mm breite, senkrecht zur Laufrichtung liegende Streifen zerteilt. Im Eluat jeder Zone wurden enthaltene Radioaktivität und die Menge an Scopolamin bestimmt. Die Auswertung ergab einen konstanten Wert der spezifischen Radioaktivität des Scopolamins von 17 MBq/mmol für jede Fraktion, in der Radioaktivität nachgewiesen wurde.

Für 6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde die deckungsgleiche Lage von Schwärzung und Substanzfleck auf allen eindimensionalen Chromatogrammen beobachtet. Auf dem zweidimensionalen Chromatogramm überlagerten sich die beiden jedoch nur mit zwei Dritteln ihrer Fläche. Die endgültige Identifizierung dieses Metaboliten wird im übernächsten Abschnitt beschrieben.

Die zweidimensionalen Chromatogramme wurden auf das Auftreten weiterer Produkte der Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin untersucht. Die Abbildung 54 zeigt eine solche Autoradiographie. Deutlich sind die Schwärzungen bei 0,27/0,05 für 6 β -Hydroxyhyoscyamin, bei 0,46/0,10 für Hyoscyamin und

Scopolamin

Hyoscyamin

6 β -Hydroxy-
hyoscyamin

LM 2

Start

LM 4



Abb. 54: In vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger Hn 61. Autoradiogramm nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie des Wurzelextrakts nach viertägiger Biotransformation (s. Tabelle 30). Anfertigung von Autoradiogrammen s. II.3.5.

bei 0,83/0,62 für Scopolamin zu erkennen. Die schwachen Flecken bei 0,04 - 0,19/0,02 traten auch auf, wenn ^{14}C -Hyoscyamin im Medium ohne Wurzelgewebe den Kulturbedingungen unterworfen wurde. Der schwache Fleck bei 0,29/0,02 stellt wohl ein Biotransformationsprodukt dar, konnte aber keiner Referenzsubstanz zugeordnet werden. Weitere Produkte konnten nicht detektiert werden. Insbesondere trat keine Schwärzung für Dehydrohyoscyamin auf, die bei 0,73/0,35 zu suchen war.

13.3. Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin in Duboisia-Pflanzen

Von den Pflanzen des Hybrids Duboisia myoporoides R.Br. x Duboisia leichhardtii F.Muell. war bekannt, daß im Vergleich zu Hyoscyamus niger 6 β -Hydroxyhyoscyamin einen größeren Anteil der Gesamtalkaloide ausmacht (GRIFFIN, 1975).

Eine Triebspitze mit fünf Blättern wurde von einer Duboisia-Pflanze aus dem Gewächshaus abgetrennt. Sie wurde sofort in die Lösung von 49 kBq (= 1,3 μCi) ^{14}C -Hyoscyamin in 1 ml Leitungswasser gestellt. Der Zeitraum für die in vivo-Transformation betrug sieben Tage. War der Wasservorrat auf 0,1 ml abgesunken, wurde mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Triebspitze wurde aufgearbeitet wie unter II.3.5. für Wurzelmaterial nach der Umsetzung radioaktiv markierter Substanzen beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.

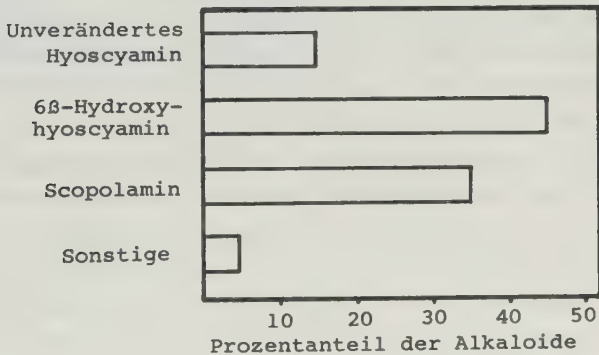


Abb. 55: In vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in einer Triebspitze des Duboisia-Hybrids. Versuchsbeschreibung im Text. Die Prozentangaben beziehen sich auf die gesamte wiedergefundene Radioaktivität. Sie betrug 80% der eingesetzten Aktivität von 58 kBq (= 1,6 μCi).

Bei der Duboisia-Pflanze lag fast die Hälfte der in Form von ^{14}C -Hyoscyamin eingesetzten Radioaktivität nach der Biotransformation als 6 β -Hydroxyhyoscyamin vor. Hierdurch unterschied sich das Resultat von dem der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur. Nachgewiesen wurden außerdem ^{14}C -Hyoscyamin und ^{14}C -Scopolamin. Nach zweidimensionaler Chromatographie des Extrakts wurden auch auf dem Autoradiogramm keine weiteren Alkaloide, insbesondere kein Dehydrohyoscyamin, detektiert.

13.4. Identifizierung von 6 β -Hydroxyhyoscyamin

6 β -Hydroxyhyoscyamin gilt als Zwischenprodukt des Biosynthesewegs, der von Hyoscyamin zu Scopolamin führt. Es wurde als natürlicher Inhaltsstoff verschiedener Solanaceen-Arten (ROMEIKE, 1978) und als Biokonversionsprodukt von Hyoscyamin aufgefunden. Auch seine Biotransformation zu Scopolamin wurde nach einem Versuch mit unmarkiertem Alkaloid und alkaloidfreien Datura-Trieben beschrieben (ROMEIKE, 1960b; 1962; ROMEIKE und FODOR, 1960). Um diesen Metaboliten im Rahmen dieser Arbeit zweifelsfrei als Biotransformationsprodukt von Hyoscyamin nachzuweisen, sollte das Alkaloid isoliert und seine Identität bestätigt werden.

Als Ausgangsmaterial dienten 68 g der frischen Blätter der Duboisia-Hybride. Das Material wurde mit flüssigem Stickstoff eingefroren, zerkleinert und gefriergetrocknet. Die Extraktion erfolgte mit viermal 300 ml Methanol bei 40°C über insgesamt 24 Stunden. Aus dem Trockenrückstand des Extrakts wurden die Alkaloide mit 0,1 N HCl herausgelöst. Diese Lösung wurde filtriert, mit Ammoniak alkalisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bis auf einen öligen Rückstand eingengt.

Als Referenzsubstanz bei der weiteren Reinigung diente das vermutliche ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin, das nach der Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin aus den Duboisia-Blättern ge-

wonnen wurde. Ein Aliquot des Extrakts wurde im Laufmittel 8 chromatographiert und die der 6 β -Hydroxyhyoscyamin-Referenzsubstanz entsprechende Zone eluiert. Das gewonnene Alkaloid wurde in Laufmittel 2 nochmals chromatographiert und die entsprechende Zone zurückgewonnen.

Die weitere Auftrennung des Alkaloidgemisches aus den Duboisia-Blättern geschah mittels der Dünnschichtchromatographie. Nach jedem Trennschritt wurde die der Referenzsubstanz entsprechende Zone eluiert. Nacheinander wurden die Laufmittelsysteme 8, 10 (mit zweimaligem Entwickeln vor der Detektion) und 2 verwendet. Die Ausbeute waren 5 mg eines weißen Schaums, dem durch Trocknung nach Zusatz weniger Tropfen Benzol die letzten Wasserspuren entzogen wurden.

Das Massenspektrum der Substanz (EI-MS) zeigte folgende Bruchstücke: 305 (M^+), 261, 167, 156, 149, 140, 122, 121, 112, 110, 103. Die Substanz zeigte damit gute Übereinstimmung mit dem Spektrum der synthetischen Referenzsubstanz (s. II.8.) und den Literaturangaben für 6 β -Hydroxyhyoscyamin (CONG, 1981). Für den Strukturbeweis waren besonders wichtig die Peaks bei 305 (M^+) und 261 (großes Fragment nach Bruch zwischen C-1 und C-7 sowie C-5 und C-6) und das Verhältnis von 10:1 der relativen Intensitäten für die Bruchstücke 140 und 156. Dieses Verhältnis trat bei Hyoscyamin zwischen den entsprechenden Fragmenten 124 und 140 auf.

Das ^1H -Kernresonanzspektrum der Substanz in CDCl_3 zeigt die Abbildung 56. Erwartungsgemäß bestand das durch hydrogenolytische Spaltung des Epoxidrings im Scopolamin entstandene 6 β -Hydroxyhyoscyamin aus einem Gemisch von zwei Diastereomeren. Die isolierte Substanz lieferte jedoch nur das NMR-Spektrum eines dieser beiden Stereoisomeren.

Einen Ausschnitt der zweidimensionalen Darstellung des ^1H -Kernresonanzspektrums von 6 β -Hydroxyhyoscyamin zeigt die Abbildung 57. In diesem Konturdiagramm liegt das eindimensionale Spektrum auf der Diagonalen, während die Markierungen außerhalb der Diagonalen, die sogenannten Crosspeaks,

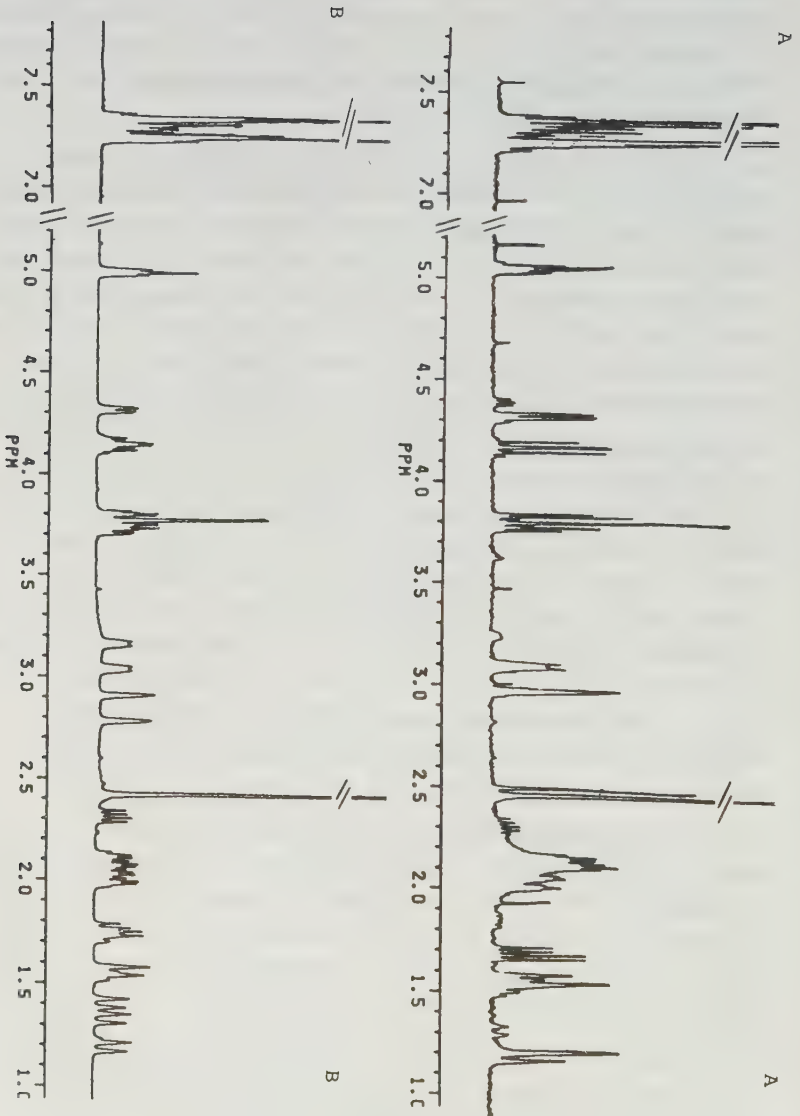


Abb. 56: ^1H -Kernresonanzspektrum von natürlichem 6 β -Hydroxyhyoscyamin, isoliert aus *Duboisia* (A), und dem Produkt der Synthese nach FODOR *et al.* (1962) (B). Chloroform-D, 360 MHz

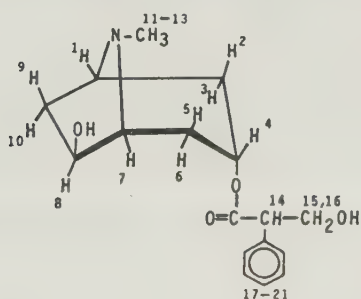
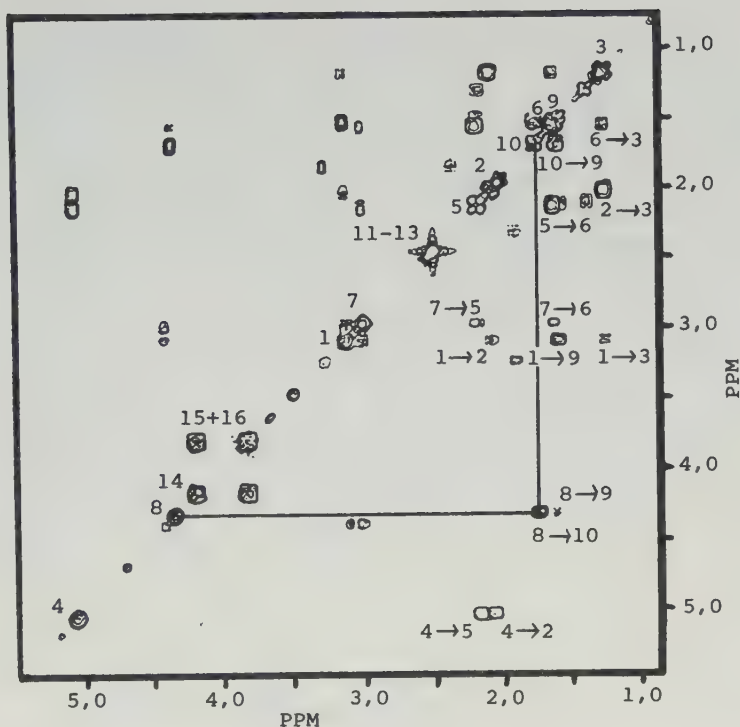


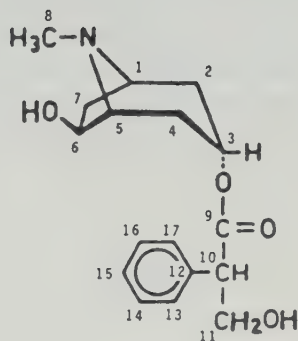
Abb. 57: Zweidimensionale Darstellung eines Ausschnittes des ^1H -Kernresonanzspektrums von 6 β -Hydroxyhyoscyamin, isoliert aus *Duboisia* (COSY-Spektrum). Chloroform-D, 360 MHz. In der Strukturformel ist die Zählweise für die Zuordnung der H-Atome dargestellt.

homonukleare Kopplungen anzeigen. Die senkrechten Verbindungslinien, wie für H-8-->H-10 eingezeichnet, erlaubten es, diesem COSY-Spektrum (von correlated spectroscopy) die Kopplungspartner zu entnehmen. Die H-Atome 4, 8, 11-13, 14, 15, 16 und 17-21 konnten aufgrund theoretischer Überlegungen und der Literaturdaten (MANDAVA und FODOR, 1968; OHASHI *et al.*, 1971; STENBERG *et al.*, 1977; LIU und XIE, 1979) den verschiedenen Peaks zugeordnet werden. H-8 zeigte eine starke Kopplung mit dem in derselben Ebene liegenden H-10 und eine schwächere mit H-9. H-1 und H-7 koppelten nicht mit H-10 bzw. H-8. H-1 wies mit H-2, H-3 und H-9 drei Crosspeaks auf, während H-7 zwei Crosspeaks mit H-5 und H-6 zeigte. H-2 und H-3 sowie H-5 und H-6 koppeln miteinander. Außerdem kommt es wegen der starren W-Stellung im Sechsring zu einer 4J -Fernkopplung (HESSE *et al.*, 1984) zwischen den H-Atomen in äquatorialer Stellung. Da der Sechsring im Tropangerüst in der Sesselform vorliegt (MANDAVA und FODOR, 1968), sind dies die Atome H-3 und H-6. Die H-Atome H-2 und H-5 in axialer Stellung koppeln mit H-4. Mit den Informationen aus dem COSY-Spektrum war so die eindeutige Zuordnung der Signale aller H-Atome möglich. Die Zusammenfassung des Spektrums sah folgendermaßen aus (ppm-Werte): 1,19 - 1,23 (d, 1H, H-3); 1,55 - 1,61 (m, 2H, H-6, H-9); 1,68 - 1,74 (m, 1H, H-10); 2,02 - 2,07 (m, 1H, H-2); 2,12 - 2,17 (m, 1H, H-5); 2,47 (s, 3H, NCH₃); 2,97 (s, 1H, H-7); 3,09 (d, 1H, H-1); 3,75 - 3,83 (m, 2H, H-15, H-16); 4,13 - 4,18 (m, 1H, H-14); 4,30 - 4,33 (m, 1H, H-8); 5,02 (t, 1H, H-4); 7,24 - 7,34 (m, 5H, Aromat).

Das ^{13}C -Kernresonanzspektrum der isolierten Substanz glich dem entsprechenden Spektrum des synthetischen 6 β -Hydroxyhyoscyamins. Die Signale aller C-Atome wurden in Tabelle 31 aufgeführt. Die Zuordnung der einzelnen C-Atome zu ihren Peaks wurde durch das zweidimensionale HETCOR-Spektrum (heteronuclear correlated spectroscopy) der synthetischen Referenzsubstanz ermöglicht. In diesem Aufnahmeverfahren werden Kopplungen verschiedener Kernarten, in diesem Fall ^1H und ^{13}C , gemessen. Ist die Lage der Signale einer Kernart,

^{13}C -Signal (ppm) C-Atom

28,7	C-4
29,9	C-2
36,4	C-8
39,8	C-7
54,3	C-11
58,1	C-1
64,2	C-10
66,9	C-5
67,8	C-3
75,8	C-6
127,9 - 129,0	C-13 - C-17
135,4	C-12
172,1	C-9



Tab. 31: Zuordnung der Signale des ^{13}C -Kernresonanzspektrums von 6 β -Hydroxyhyoscyamin (Messung in CDCl_3 , 90,6 MHz; chemische Verschiebung in ppm)

in diesem Beispiel ^1H , bekannt, kann dem Spektrum die Zuordnung der Signale der anderen Kernart unmittelbar entnommen werden. Das HETCOR-Spektrum ist in Abbildung 58 dargestellt.

Der optische Drehwert ($[\alpha]_D$) der isolierten Substanz betrug $-7,0^\circ$ ($c=0,17$, H_2O). Ähnliche $[\alpha]_D$ -Werte ($-6,8^\circ$ bis $-10,5^\circ$) wurden für das authentische (-)-6 β -Hydroxyhyoscyamin veröffentlicht (ROMEIKE, 1962; FODOR et al., 1962; HASHIMOTO und YAMADA, 1986). Dies belegte für die isolierte Substanz die 3S:6S-Konfiguration, die der authentischen Substanz zugeschrieben wird (FODOR und SOTI, 1964; ROMEIKE, 1978).

Weder Kernresonanzspektren noch Massenspektrum wiesen auf das Vorliegen weiterer Substanzen in dem isolierten Alkaloid

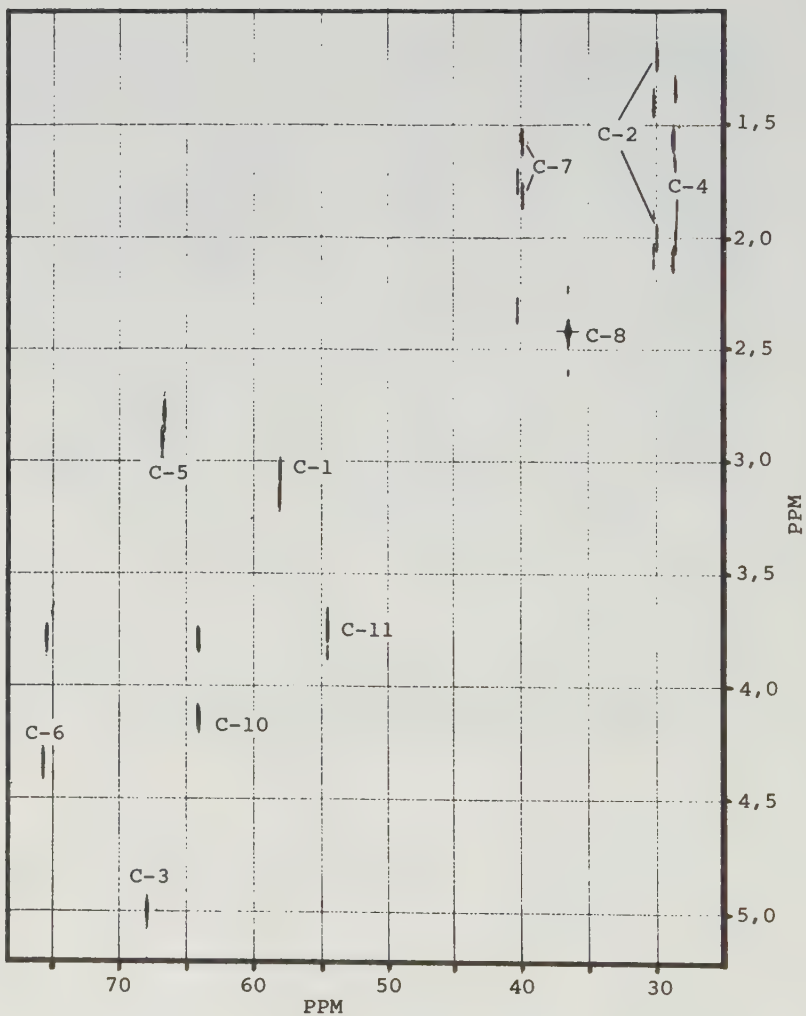


Abb. 58: Zweidimensionale Darstellung eines Ausschnittes des ^1H - ^{13}C -HETCOR-Spektrums von 6 β -Hydroxyhyoscyamin. Chloroform, 360 MHz Die Zählweise für die Zuordnung der C-Atome ist in der Tabelle 31 dargestellt.

hin. Damit war das 6 β -Hydroxyhyoscyamin als Produkt der Biotransformation von Hyoscyamin gesichert. Einen Hinweis für die Erklärung des Laufverhaltens in der zweidimensionalen Chromatographie (s. III.13.2.) lieferte das ^1H -Kernresonanzspektrum der Referenzsubstanz von Prof. Peigen. Es glich völlig dem des Diastereomergemisch, das als Produkt der Synthese nach II.8. erhalten wurde. Es handelte sich bei dieser Referenzsubstanz also nicht um das reine (-)-6 β -Hydroxyhyoscyamin.

13.5. Untersuchung der Rolle von 6 β -Hydroxyhyoscyamin in der Biosynthese von Scopolamin

Entsprechend seiner Synthese (s. II.8.) könnte 6 β -Hydroxyhyoscyamin auch in der pflanzlichen Zelle als Reduktionsprodukt aus Scopolamin entstehen. Die Biotransformation von ^{14}C -Scopolamin diente der Untersuchung dieser Möglichkeit.

^{14}C -Scopolamin stand nach der in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in Hyoscyamus niger-Wurzelkulturen zur Verfügung (s. III.13.2.). Aus dem Rückstand des Extrakts wurden die Alkaloide mit 0,1 N HCl herausgelöst. Die Lösung wurde alkalisiert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Auftrennung der Alkaloide erfolgte dünnschichtchromatographisch im Laufmittelsystem 2. Die Reinheitsprüfung des erhaltenen ^{14}C -Scopolamins durch Chromatographie im Laufmittel 4 ergab, daß 98% der Radioaktivität auf den Scopolamin-Substanzfleck entfielen, der Rest war keinem distinkten Signal zuzuordnen. Das Produkt erlaubte also die Detektion von Abbauprodukten.

Die Anzucht der Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61 geschah im LSY-Medium. Sie wurden dann mit 10 mg TG in 13 ml LSY-Medium angeimpft, das 6% Saccharose enthielt. Nach neun Tagen Wachstum wurde die Kultur mit 18,5 kBq (= 500 nCi) ^{14}C -Scopolamin versetzt, nach weiteren fünf Tagen gemäß II.3.5. aufgearbeitet. Die wiedergefundene Radioaktivität betrug 14,9 kBq (81%), wovon 12,7 kBq im Wurzelextrakt ent-

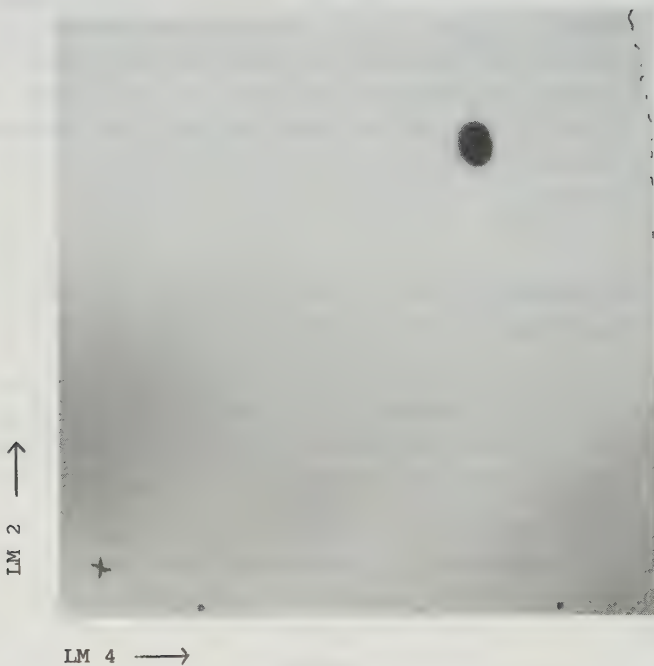


Abb. 59: Versuch der *in vivo*-Umsetzung von ^{14}C -Scopolamin in einer Wurzelkultur von *Hyoscyamus niger* Hn 61. Autoradiogramm nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie des Wurzelextrakts nach fünftägiger Biotransformation. Anfertigung von Autoradiogrammen s. II.3.5.
 +Start Schwärzung durch ^{14}C -Scopolamin
 Die Laufmittelfronten des Chromatogramms decken sich mit den Rändern der Photographie.

halten waren. Sie lag zu 99% als ^{14}C -Scopolamin vor. Die Abbildung 59 zeigt das Autoradiogramm nach zweidimensionaler Chromatographie des Wurzelextrakts. Schwärzungen bei den Rf-Werten von 6 β -Hydroxyhyoscyamin oder Hyoscyamin waren darauf nicht zu erkennen. Diese Alkaloide entstanden in der Wurzelkultur also nicht durch Biokonversion von Scopolamin.

6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde als Zwischenprodukt der Biotransformation von Hyoscyamin zu Scopolamin vorgeschlagen (s.I.). In diesem Fall könnte die künstliche Zufuhr von 6 β -Hydroxyhyoscyamin während der in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin die Anreicherung von ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin bewirken. An der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61/11 sollte die gleichzeitige Biotransformation von 6 β -Hydroxyhyoscyamin und ^{14}C -Hyoscyamin untersucht werden.

Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen. Anschließend wurden in jeden der Versuchskolben, die 13 ml LSY-Medium mit 6% Saccharose enthielten, Wurzeln entsprechend 10 mg TG gegeben. Nach acht Tagen Wachstum wurde ein Kolben mit 2,0 mg 6 β -Hydroxyhyoscyamin versetzt, entsprechend einer Konzentration von 0,5 mmol/l. Am nächsten Tag wurde dieser und einer weiteren Kultur 29,3 kBq (= 794 nCi) ^{14}C -Hyoscyamin zuge-setzt. Fünf Tage später erfolgte die Aufarbeitung nach II.3.5. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 60. Nach Detektion mit Dragendorffs Reagens ließ das Dünnschichtchromatogramm erkennen, daß ein großer Teil des zugegebenen 6 β -Hydroxyhyoscyamins im Wurzelextrakt enthalten war.

Unmarkiertes 6 β -Hydroxyhyoscyamin verhinderte die Aufnahme von ^{14}C -Hyoscyamin in die Wurzelzellen nicht, hemmte jedoch seinen Einbau in Scopolamin. Die Scopolaminproduktion stieg dabei ohne gleichzeitige Zunahme des Trockengewichts von 27 mg/l auf 40 mg/l, was einem rechnerischen Umsatz von 9% des eingesetzten 6 β -Hydroxyhyoscyamins zu Scopolamin entsprach. ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde unter diesen Versuchsbedingungen nicht abgefangen. In beiden Kulturen betrug der Anteil dieses Alkaloids an der Gesamtradioaktivität 3% und lag damit in der Größenordnung früher beschriebener Ergebnisse (vgl. III.13.2.).

Durch die in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin in Triebspitzen von Duboisia-Pflanzen bestand die Möglichkeit, ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin in weit besserer Ausbeute als durch die Hyoscyamus niger-Wurzelkultur zu gewinnen (vgl. III.13.3).

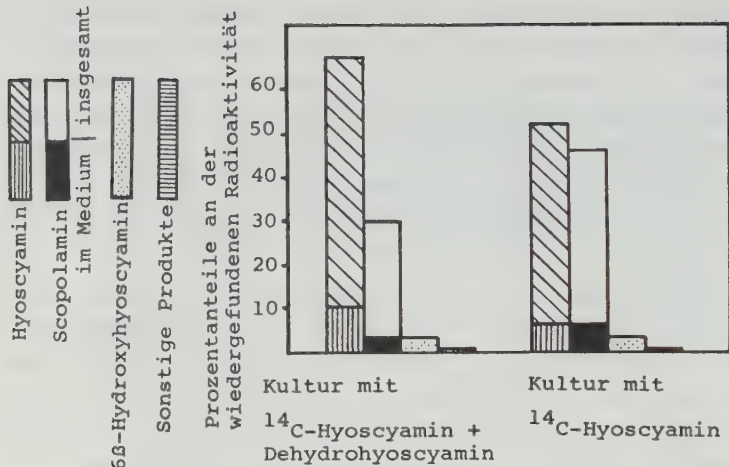


Abb. 60: Unterschiedliche in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin durch die Kultur *Hyoscyamus niger* Hn 61 in Gegenwart und Abwesenheit von 6β-Hydroxyhyoscyamin. Konzentration von 6β-Hydroxyhyoscyamin: 0,5 mmol/l. Wiedergefundene Radioaktivität: 97% der eingesetzten Radioaktivität (29,4 kBq = 794 nCi) im Kolben ohne, 88% im Kolben mit 6β-Hydroxyhyoscyamin.

Seine Reinigung wurde unter III.13.4. beschrieben. Nach zweidimensionaler Chromatographie zeigte das Autoradiogramm die Abwesenheit von ^{14}C -Hyoscyamin und ^{14}C -Scopolamin.

Zur Untersuchung der Biotransformation dieses radioaktiv markierten 6β-Hydroxyhyoscyamins wurden Wurzeln des *Hyoscyamus niger*-Stammes Hn 61 verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 zusammengefaßt. Die Auswertung der Autoradiogramme nach zweidimensionaler Chromatographie ergab keinen Hinweis auf das Vorkommen von ^{14}C -Hyoscyamin. Die "sonstigen Produkte" im Medium ohne Wurzelgewebe verursachten ganz schwache Schwärzungen im untersten Rf-Bereich des Chromatogramms.

	Wurzelkultur H. niger Hn	Medium ohne Wurzel- gewebe
Eingesetzte Radioaktivität	3,3 kBq	3,3 kBq
Wiedergefundene Radioaktivität	3,0 kBq = 100%	3,3 kBq = 100%
in den Wurzeln	2,6 kBq = 87 %	---
als 6 β -Hydroxyhyoscyamin	630 Bq = 21 %	---
als Scopolamin	2,0 kBq = 66 %	---
im Medium	410 Bq = 13 %	3,3 kBq = 100%
als 6 β -Hydroxyhyoscyamin	190 Bq = 6 %	3,2 kBq = 97 %
als Scopolamin	220 Bq = 7 %	0 kBq = 0 %
sonstige Produkte	0 kBq = 0 %	0,1 kBq = 3 %
Bilanz der <u>in vivo</u> -Umsetzung		
unverändert als 6 β -Hydroxy- hyoscyamin	820 Bq = 27 %	3,2 kBq = 97 %
Einbau in Scopolamin	2,2 kBq = 73 %	0 kBq = 0 %
sonstige Produkte	0 kBq = 0 %	0,1 kBq = 3 %

Tab. 32: Ergebnisse der Biotransformation von ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin in der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61. Dauer der in vivo-Umsetzung: 5 Tage. Aufarbeitung der Kulturen gemäß II.3.5. Die Wurzeln wurden in LSY-Medium angezogen und mit 11 mg TG in 13 ml LSY-Medium (6% Saccharose) angeimpft. Nach siebentägiger Kultivierung wurden die Wurzeln und als Kontrolle ein gleicher Kolben ohne Wurzelgewebe mit 3,3 kBq (= 88 nCi) ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin versetzt. Die Aufarbeitung nach II.3.5. erfolgte weitere fünf Tage später.

Das aus den Duboisia-Blättern isolierte ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde von der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur gut in die Zellen aufgenommen und zu 68% in Scopolamin eingebaut. 6 β -Hydroxyhyoscyamin ist damit eine biosynthetische Vorstufe des Scopolamins.

13.6. Untersuchung der Rolle von Dehydrohyoscyamin in der Biosynthese von Scopolamin

Die Kapillar-Gaschromatographie (GLC) eignet sich sehr gut zur Auftrennung komplexer Alkaloidgemische und zum Nachweis kleinster Stoffmengen (WINK et al., 1982). Die Untersuchung des Alkaloidgemisches aus Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61/11.2 sollte Aufschluß über ein mögliches Vorkommen von Dehydrohyoscyamin geben. Die Wurzeln, entsprechend 0,7 g TG, nach zwölf-tägiger Kultur aus LSY-Medium gereinigt, wurden in 0,5 N HCl homogenisiert und nach 30 min abzentrifugiert. Nach Alkalisieren mit Natronlauge wurde der Extrakt auf eine Extrelut-Säule (Chem Lut 1020, Fa. Analytisch International, Harbor City, USA) gegeben. Das Alkaloidgemisch wurde mit 60 ml Dichlormethan eluiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 2,0 ml Methanol aufgenommen. Das GLC-Chromatogramm des Alkaloidgemisches zeigt die Abbildung 61. Bei der Retentionszeit des authentischen Dehydrohyoscyamins war kein Signal zu erkennen. Nach starker elektronischer Verstärkung aller Signale konnte die notwendige Peakhöhe gegenüber der Basislinie und damit die Nachweisempfindlichkeit des Testsystems abgeschätzt werden. Sie betrug den 640. Teil des Scopolaminpeaks. Das Wurzelmaterial von Hyoscyamus niger Hn 61/11.2 enthielt also kein Dehydrohyoscyamin. Diese Aussage galt auf der Basis einer Nachweisgrenze von 0,0005% vom Trockengewicht.

Bei der Untersuchung der Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin konnte kein Hinweis auf das Auftreten von ^{14}C -Dehydrohyoscyamin gefunden werden (vgl. III.13.2./3.). Ein denkbarer Grund hierfür wäre eine sehr geringe stationäre Kon-

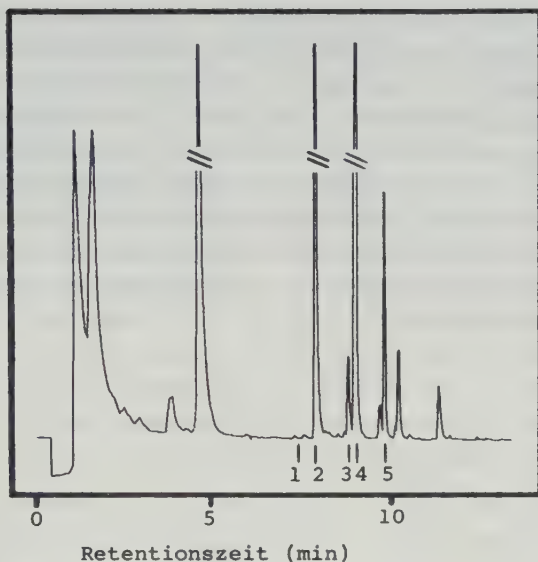


Abb. 61: Auftrennung des Alkaloidgemisches aus der Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61/11.2 durch die kapillare Gaschromatografie (GLC). Die Identifizierung der Peaks erfolgte über die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen. Dabei entstanden die Apoderivate der Alkaloide durch die Versuchsbedingungen; sie waren also nicht notwendigerweise originäre Inhaltsstoffe der Pflanze.
 1: Dehydrohyoscyamin 2: Hyoscyamin 3: Apoaotropin 4: Scopolamin 5: Aposcopolamin

zentration dieser Substanz in der pflanzlichen Zelle, wodurch sie dem Nachweis entginge.

Durch künstliche Erhöhung der Dehydrohyoscyamin-Konzentration in der Zelle während der in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin wurde versucht, radioaktiv markiertes Dehydrohyoscyamin abzufangen und so seine Entstehung in der Pflanze zu beweisen. Wurzeln des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61 wurden hierfür in LSY-Medium angezogen und mit 14 mg TG in 25 ml

LSY-Medium angeimpft. Nach zwölftägiger Kultivierung wurden 3,2 mg Dehydrohyoscyamin, entsprechend einer Konzentration von 1 mmol/l, und 58,8 kBq (= 1,59 μ Ci) 14 C-Hyoscyamin zugegeben. Ein Vergleichskolben erhielt nur 14 C-Hyoscyamin. Die Aufarbeitung gemäß II.3.5. erfolgte weitere fünf Tage später. Durch die Verwendung des Scopolamin-Enzymimmuntests war es trotz des Gehalts an radioaktiv markierten Substanzen möglich, die in Wurzelextrakten und Medien enthaltenen Mengen an Scopolamin zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 62 zusammengefaßt.

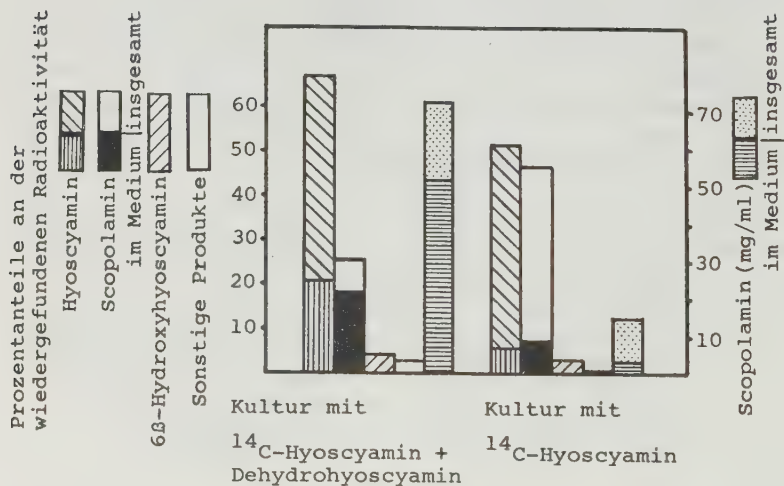


Abb. 62: Unterschiedliche in vivo-Umsetzung von 14 C-Hyoscyamin durch die Kultur *Hyoscyamus niger* Hn 61 in Gegenwart und in Abwesenheit von Dehydrohyoscyamin. Konzentration von Dehydrohyoscyamin: 1,0 mmol/l. Aufarbeitung gemäß II.3.5. nach fünftägiger Bio-konversion. Wiedergefundene Radioaktivität: 98% der eingesetzten Radioaktivität von 59 kBq (1,6 μ Ci) in beiden Kolben.

Die Zugabe von unmarkiertem Dehydrohyoscyamin hemmte den Einbau von ^{14}C -Hyoscyamin in Scopolamin. Die Scopolaminproduktion nahm gleichzeitig um 58 mg/l auf 72 mg/l zu. Dies ergab rechnerisch einen Umsatz von 24% des eingesetzten Dehydrohyoscyamins in Scopolamin. Früherer Versuche zur Biotransformation dieses Alkaloids (vgl. III.13.1.) lieferten ähnliche Ergebnisse. Radioaktiv markiertes Dehydrohyoscyamin wurde nicht abgefangen. Selbst auf den Autoradiogrammen nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie von Extrakt und Medium konnten keine dementsprechenden Schwärzungen erkannt werden. Die Detektion mit Dragendorffs Reagens erlaubte dagegen den Nachweis, daß zum Zeitpunkt des Aufarbeitens der Kultur noch unverändertes Dehydrohyoscyamin in Medium und Wurzelgewebe vorhanden war.

Auch in weiteren Versuchen mit unterschiedlicher Dauer der Biotransformation der beiden Substanzen wurde niemals das Auftreten von radioaktiv markiertem Dehydrohyoscyamin beobachtet.

Weiteren Aufschluß über die mögliche Rolle von Dehydrohyoscyamin in der Biosynthese von Scopolamin sollte die in vivo-Umsetzung von N-Methyl- ^{14}C -6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin geben. Das geeignete Pflanzenmaterial für diesen Versuch war eine Triebspitze der Duboisia-Hybride. Sowohl 6 β -Hydroxyhyoscyamin als auch Scopolamin konnten auf den Ausbau der radioaktiven Markierungen untersucht werden.

Wie unter III.13.3. beschrieben, wurde eine Triebspitze zur Biotransformation von radioaktiv markiertem Hyoscyamin benutzt. Die Lösung enthielt N-Methyl- ^{14}C -6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin mit 1,87 kBq (= 50,5 nCi) ^{14}C -Aktivität und 7,47 kBq (= 202 nCi) ^3H -Aktivität. Das Verhältnis ^3H : ^{14}C betrug 4:1. Nach sieben Tagen wurde das Pflanzenteil nach der Vorschrift für Wurzelmaterial unter II.3.5. aufgearbeitet. Die ausgeschüttelten Gesamtalkaloide enthielten 73% (5,45 kBq) der ^3H -Aktivität und 72% (1,35 kBq) der ^{14}C -Aktivität.

Die Auftrennung des Alkaloidgemisches erfolgte dünnsschicht-

chromatographisch. Im ersten Schritt wurde Laufmittelsystem 8 verwendet. Das Diagramm der Radioaktivitätsverteilung dieses Chromatogramms wies drei Signale bei den Rf-Werten der Referenzsubstanzen Scopolamin, Hyoscyamin und 6 β -Hydroxyhyoscyamin auf. Ihre Stärke verhielt sich wie 1 : 1,8 : 1,3. Dies gab annähernd das molare Verhältnis der Produkte aus der Umsetzung von N-Methyl- ^{14}C -6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin wieder, da bei der Radioaktivitätsmessung auf dem Linear-Scanner die ^3H -Aktivität eine untergeordnete Rolle spielte. Die den drei Alkaloiden entsprechenden Zonen wurden getrennt eluiert. In einem Aliquot wurde das ^3H : ^{14}C -Verhältnis für jedes Alkaloid bestimmt. Die drei Produkte wurden dann für sich nacheinander in weiteren Laufmittelsystemen chromatographiert, worauf jeweils die Bestimmung des ^3H : ^{14}C -Verhältnisses folgte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 dargestellt.

Die Produkte wurden zu einem konstanten ^3H : ^{14}C -Verhältnis gereinigt. Dieses blieb bei Hyoscyamin gegenüber der Ausgangssubstanz nahezu unverändert. Nach dem ersten Reinigungsschritt muß noch eine Verunreinigung durch eine Substanz mit höherem ^3H : ^{14}C -Verhältnis, möglicherweise Norhyoscyamin, vorgelegen haben. Beim Einbau von N-Methyl- ^{14}C -6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin in Scopolamin gingen sieben Achtel der ^3H -Aktivität im Verhältnis zur ^{14}C -Aktivität verloren. Bei der Bildung des Epoxidrings im Scopolamin wurden also beide β -ständigen H-Atome ausgebaut. Der Rest an Tritiumaktivität im Scopolamin mag durch einige Tritiumatome in stereochemisch falscher Stellung im 6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin verursacht sein. Die Synthese durch eine stereospezifisch gelenkte Addition von Tritium an eine Doppelbindung sprach für diese Erklärung. Ein ähnliches Ergebnis erhielten LEETE und LUCAST (1976) bei der Biosynthese von Scopolamin aus 6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Tropin in Datura-Pflanzen.

Beim Einbau von N-Methyl- ^{14}C -6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -Hyoscyamin in 6 β -Hydroxyhyoscyamin ging die Hälfte der Tritiumaktivität im Verhältnis zur ^{14}C -Aktivität verloren. Das Tritiumatom in 6 β -Stellung wurde also durch die Hydroxylgruppe ersetzt, das

14. Nachweis der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase in der Wurzelkultur des Hyoscyamus niger-Stammes Hn 61/11.2

Während der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit beschrieben HASHIMOTO und YAMADA (1986) das Vorkommen einer Hydroxylase in Wurzelkulturen verschiedener Solanaceen-Arten, die die Umsetzung von Hyoscyamin zu 6 β -Hydroxyhyoscyamin katalysierte. Dieses Enzym sollte auch in der hier etablierten Wurzelkultur Hyoscyamus niger Hn 61/11.2 nachgewiesen werden.

HASHIMOTO und YAMADA (1986) hatten zum Nachweis der Enzymaktivität die Produkte der Umsetzung durch GLC aufgetrennt. Für die vorliegende Arbeit enthielt der Testansatz zusätzlich ^{14}C -Hyoscyamin, die Produkte wurden anschließend dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Der vollständige Testansatz enthielt 0,05-0,3 mg Protein, 3,0 kBq ^{14}C -Hyoscyamin, 1,0 mmol/l 2-Oxoglutarat, 4,0 mmol/l Natriumascorbat und 0,4 mmol/l Fe(II)SO_4 in 1 ml 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5. Während der Inkubation bei 30°C wurden die Ansätze alle 5 min mit Sauerstoff begast. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Proteinlösung gestartet und nach 80 min mit 0,15 ml 1,2 M Na_2CO_3 -Lösung pH 10 abgestoppt. Die Produkte wurden zweimal mit 0,5 ml Chloroform ausgeschüttelt, mit je 50 μg Hyoscyamin und 6 β -Hydroxyhyoscyamin versetzt und im Laufmittelsystem 12 aufgetrennt. Die Messung der Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm erlaubte die Berechnung des prozentualen Umsatzes von Hyoscyamin in 6 β -Hydroxyhyoscyamin.

Der Proteinrohextrakt (s. II.6.) wurde durch eine Ammoniumsulfatfällung fraktioniert. Das zwischen 55 und 80% Ammoniumsulfatsättigung ausgefallene Protein wurde durch Zentrifugation (13000 g, 20 min) gesammelt und in wenig 0,05 M Tris-Puffer pH 7,5, der zusätzlich 1 mmol/l Dithiothreitol enthielt, aufgenommen. Niedermolekulare Bestandteile wurden durch Gelfiltration an Sephadex G 25 entfernt.

Die Proteinlösung wurde dann einer Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen (s. II.7.3.). Die Abbildung 63 zeigt das Elutionsprofil. Aus dem Aktivitätsmaximum bei dem Elutions-

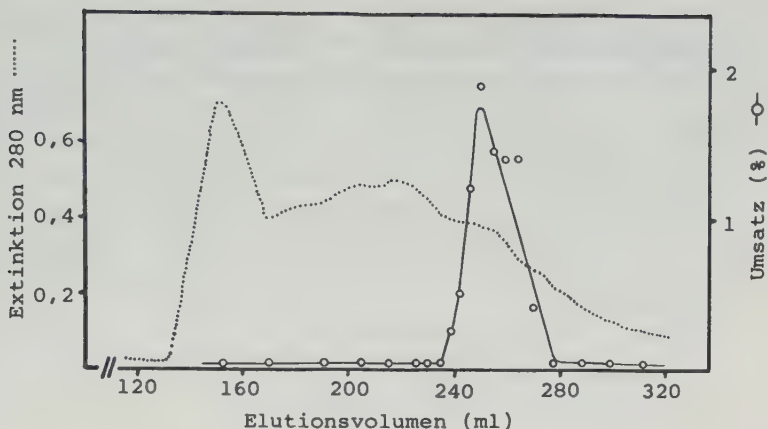


Abb. 63: Auftrennung eines konzentrierten Proteinrohextrakts aus der *Hyoscyamus niger*-Wurzelkultur Hn 61/11.2 (55 - 80% Ammoniumsulfatsättigung) durch Gelfiltration an Séphadex G 100. Trennbedingungen s. II.7.3. Messung der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase-Aktivität durch Umsatz von ^{14}C -Hyoscyamin (nähere Angaben im Text).

volumen von 250 ml ließ sich wegen der vorhergehenden Eichung des Trennsystems mittels der Elutionsvolumina von Dextranblau, Cytochrom C, Trypsininhibitor, Ovalbumin, BSA und Aldolase ein Molekülgewicht der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase von 39000 Dalton berechnen. Dies entsprach der Angabe von YAMADA *et al.* (1986), die den Wert 41000 Dalton nannten.

Die Eluatfraktionen der Trennung mit einem Elutionsvolumen von 244 - 265 ml wurden vereinigt. An der erhaltenen Proteinlösung wurden die Auswirkungen verschiedener Änderungen des Nachweissystems auf die Enzymaktivität erprobt. Die Tabelle 34 faßt die Ergebnisse zusammen.

Für die Enzymaktivität waren Fe^{2+} -Ionen, 2-Oxoglutarat und Sauerstoff notwendig. Die geringe Aktivität bei Stickstoff-

Auslassungen im Nachweissystem der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase	Umsatz an ^{14}C -Hyoscyamin (% der Kontrolle)
---	--

Keine (Kontrolle)	100
-Proteinlösung	0
-Fe(II)SO ₄	0
-Natriumascorbat	65
-2-Oxoglutarat	0
-O ₂ -Begasung	100
(Zutritt von Luftsauerstoff)	
-O ₂ -Begasung (kein Zutritt von Luftsauerstoff durch Stickstoff- Begasung)	20

Tab. 34: Notwendige Cosubstrate der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase aus *Hyoscyamus niger*-Wurzelkultur Hn 61/11.2. Beschreibung des vollständigen Testansatzes im Text. Ausschluß von Sauerstoff durch fünfzehnminütiges Begasen von Testgemisch und Proteinlösung vor dem Start der Reaktion. Proteinlösung wurde nach Reinigung durch Ammoniumsulfatfällung und Sephadex G 100-Gelfiltration verwendet.

begasung konnte auf nicht restlos verdrängten Sauerstoff zurückgeführt werden. Der Zusatz von Ascorbat förderte die Enzymaktivität. Diese Ergebnisse entsprachen der Einordnung der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase als 2-oxoglutarat-abhängiger Dioxygenase durch HASHIMOTO und YAMADA (1986).

Dieses Enzym soll außerdem die Umsetzung von Dehydrohyoscyamin zu Scopolamin katalysieren (YAMADA et al., 1986). Für diese Versuche wurde im Nachweissystem für die Enzymaktivität (s.o.) das ^{14}C -Hyoscyamin durch 3,2 μg Dehydrohyoscyamin ersetzt. Die Produkte wurden nach dem Ausschütteln über eine Extrelut-Säule gereinigt und mittels kapillarer Gaschromato-

graphie aufgetrennt (s. II.7.2.). Weder die Proteinlösung nach Ammoniumsulfatfällung und Sephadex G 25-Gelfiltration noch die Fraktion nach Sephadex G 100-Gelfiltration zeigten die angesprochene Aktivität. In beiden Präparationen war jedoch die Hyoscyamin-6 β -hydroxylase durch Umsatz von ^{14}C -Hyoscyamin nachweisbar. Es konnte also nicht bestätigt werden, daß dieselbe Proteinfraction sowohl die 6 β -Hydroxylierung am Hyoscyamin als auch die Bildung von Scopolamin aus Dehydrohyoscyamin katalysierte.

IV. DISKUSSION

Für viele Untersuchungen an Pflanzen aus der Familie der Solanaceen und ihren medizinisch wichtigen Alkaloiden sind geeignete Analysenverfahren eine wesentliche Voraussetzung. Selektionsexperimente und chemotaxonomische Fragestellungen verlangen die Bewältigung großer Probenzahlen, wobei die Spezifität des Testsystems die Messung aus komplexen Stoffgemischen erlauben sollte, wie sie Rohextrakte pflanzlicher Materialien darstellen. In vielen Fällen wird darüber hinaus eine hohe Nachweisempfindlichkeit verlangt.

Chromatographische Analysenverfahren für Tropanalkaloide erreichen Nachweisgrenzen im ng-Bereich (HARTMANN et al., 1986). Diese Ergebnisse der Kapillar-GLC mit ionenselektiver Detektion setzen anspruchsvolle Laboreinrichtungen und eine arbeitsintensive Probenvorbereitung voraus. Ähnliches gilt für andere Verfahren mit hoher Nachweisempfindlichkeit, wie sie in der Tabelle 35 kurz vorgestellt werden. Die Dauer der einzelnen Analyse beschränkt die Kapazität auf maximal fünfzig Proben pro Tag. Damit erfüllen die Verfahren nicht alle genannten Anforderungen. Ihre Vorteile kommen nur dann besonders zum Tragen, wenn eine größere Anzahl von Komponenten in einem Gemisch quantifiziert werden soll. Dies ist dann in einem Arbeitsgang möglich.

Ein interessantes Verfahren ist die Tandem-Massenspektroskopie, die sich zum Nachweis von Inhaltsstoffen ohne jede Aufarbeitung direkt aus Pflanzenmaterial eignet. Sie wurde auf Atropin in Datura stramonium-Samen angewendet (KONDRAT et al., 1978). Eine Quantifizierung des Alkaloidgehalts ist aber so nicht möglich.

Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit, ihrer ausgeprägten Spezifität und der Möglichkeit, große Probenzahlen parallel zu bearbeiten, stellen immunologische Bestimmungsverfahren geeignete Analysenverfahren dar. Für die Untersuchung pflanz-

Verfahren	Nachweis- grenze	Zeitbedarf pro Analyse	Anwendung	Literatur
HPLC	15 µg	6,5 min	Standardgemische	VERPOORTE und BAER- HEIM SVENDSON, 1976
HPLC	µg-Bereich	20 min	Pflanzenextrakte	PEKIC <u>et al.</u> , 1985
HPLC-RP	20 ng	10 min	Pharmazeutische Produkte	PENNINGTON und SCHMIDT, 1982
HPLC-RP	µg-Bereich	10 min	Pflanzenextrakte	STAHL und JAHN, 1984
GLC	--	20 min	Pflanzenextrakte	LIEBISCH <u>et al.</u> , 1973
GLC	µg-Bereich	20 min	Pflanzenextrakte	GRIFFIN <u>et al.</u> , 1975
Kapillar- GLC	ng-Bereich	30 min	Pflanzenextrakte	HARTMANN <u>et al.</u> , 1986

Tab. 35: Chromatographische Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Hyoscyamin und Scopolamin.
HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RP : Unpolare stationäre Phase ("Reversed Phase")
GLC : Gas-Flüssig-Chromatographie

licher Extrakte wendeten erstmals WEILER und ZENK (1976) einen Radioimmunist an. Sie selektionierten Digitalis lanata-Pflanzen aufgrund ihres Gehalts an dem Herzglykosid Digoxin. Ebenfalls mit Herzglykosiden beschäftigten sich VOGEL und LUCKNER (1981). Weitere Arbeiten mit phytochemischer Fragestellung behandelten Alkaloide, z.B. Opiumalkaloide (WIECZOREK, 1985) oder Indolalkaloide wie Serpentin, Ajmalicin (ARENS et al., 1978), Vindolin (WESTEKEMPER et al., 1980) und Mutterkornalkaloide (ARENS und ZENK, 1980) sowie Nikotin (WEILER und ZENK, 1981; KOLOSSA, 1983) und Solasodin (WEILER et al., 1980) als Vertreter anderer Strukturklassen. Ebenfalls mit immunologischen Bestimmungsverfahren wurden Flavonoide wie Limonin (MANSELL und WEILER, 1980; WEILER und MANSELL, 1980) und Naringin (JOURDAN et al., 1982; 1985), Sennoside (ATZORN et al., 1981) und Ginsenoside (SANKAWA et al., 1982) bearbeitet. Häufig wurden immunologische Verfah-

ren auch zum Nachweis und zur Quantifizierung verschiedener Pflanzenhormone verwendet (WEILER, 1984, und darin zitierte Literatur; HOFMAN et al., 1985; MERTENS et al., 1985).

Die ersten Radioimmuntests für Hyoscyamin wurden in Hinblick auf die klinische Chemie entwickelt. Sie benutzten Immungene, für deren Synthese der Tropasäureteil des Moleküls derivatisiert wurde. Die verwendeten Antiseren waren spezifisch gegen D-Hyoscyamin gerichtet mit Ausnahme der Arbeit von VIRTANEN et al. (1980), wo D- und L-Hyoscyamin gleichermaßen erkannt wurden. Aus derselben Arbeitsgruppe stammt auch ein Bericht über die Anwendung des Hyoscyamin-Radioimmuntests auf pflanzliche Extrakte (LEHTOLA et al., 1982). Hierfür wurden Antikörper mit Spezifität gegen D-Hyoscyamin verwendet. Dieses Enantiomer kommt in pflanzlichen Materialien nur als Abbauprodukt von L-Hyoscyamin vor. Deswegen war vor der Messung die Razemisierung von L-Hyoscyamin in jeder Probe notwendig. Dies geschah durch Einwirkung von 0,1 M Natronlauge und anschließende Neutralisierung mit HCl. Neben dem Arbeitsaufwand bringt dies die Gefahr mit sich, daß die Esterbindung im Alkaloid gespalten wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Antiseren gewonnen, die spezifisch waren für L-Hyoscyamin, die natürlich vorkommende und pharmakologisch wirksame Form des Alkaloids. Erreicht wurde dies durch die Synthese eines Immunogens, in dem die Verknüpfung von Rinderserumalbumin und Alkaloidmolekül über eine Propionsäuregruppe am Stickstoffatom hergestellt wurde. Einem anerkannten Konzept zufolge erkennen haptenspezifische Antikörper den Molekülteil besonders gut, der von der Verknüpfungsstelle entfernt liegt (BUTT, 1984). Die Antikörper eigneten sich zum Aufbau eines Radioimmuntests, der sich durch hohe Spezifität, große Genauigkeit der Meßergebnisse und eine niedrige Nachweisgrenze auszeichnete. Er erforderte keine Razemisierung von L-Hyoscyamin in den zu bestimmenden Extrakten. Die Probenvorbereitung war damit weitgehend vereinfacht. Dies und die Handhabung mit relativ

Tracer Spez. Aktivität	Spezifität	Nachweis- grenze	Anwendung	Literatur
^3H -d-Hyoscyamin 3,7-19 GBq/mmol	d-Hyoscyamin	3000 pg	Klinik	FASTH <u>et al.</u> , 1975
^3H -Atropin 144 GBq/mmol	d-Hyoscyamin	63 pg	Klinik	WURZBURGER <u>et al.</u> , 1977
^3H -Atropin 30,7 GBq/mmol	Atropin	260 pg	Klinik	VIRTANEN <u>et al.</u> , 1980
^3H -Atropin 30,7 GBq/mmol	d-Hyoscyamin	300 pg	Pflanzen- Extrakte	LEHTOLA <u>et al.</u> , 1982
^3H -Hyoscyamin 3,15 TBq/mmol	l-Hyoscyamin	10 pg	Pflanzen- extrakte	diese Arbeit

Tab. 38: Verschiedene Radioimmuntests zur Bestimmung von Atropin und Hyoscyamin im Vergleich.

wenigen Arbeitsgängen ermöglichten einer Person die Bearbeitung von einigen hundert Proben am Tag.

Bei der Entwicklung des Hyoscyamin-Radioimmuntests wurde kein käuflicher Tracer verwendet. Erfahrungen mit solchen radioaktiv markierten Pflanzeninhaltsstoffen in anderen Immuntests zeigten, daß deren Einsatz Nachteile gegenüber der Eigensynthese mit sich brachte (WEILER und ZENK, 1979; KOLOSSA, 1983). Wegen des geringen Substanzbedarfs braucht die Synthese von Norhyoscyamin, das als Ausgangsstoff für die die Synthese von ^3H -Hyoscyamin benötigt wurde, sehr lange Zeit nicht wiederholt werden. Das vereinfacht die beschriebene Synthese von ^3H -Hyoscyamin.

Für Scopolamin wurde von WEILER et al. (1981b) ein Radioimmuntest beschrieben, der bei einer Nachweisgrenze von 200 pg für die Untersuchung pflanzlicher Extrakte sehr gut geeignet ist. Ein analoges Testsystem schufen für klinische Zwecke SCHEURLIN et al. (1984) unter Verwendung von in Rattenhirn-homogenat enthaltenen Rezeptoren an Stelle des Antiserums.

Die Nachweisgrenze betrug hier 60 pg Scopolamin. Bei Anwendung auf Stoffgemische würde wohl die gesamte muscarinische Aktivität in einer Probe erfaßt.

Das Prinzip des Radioimmuntest bewährte sich zuerst auf dem Gebiet der klinischen Chemie. Hier kam es im Laufe der Zeit zur vermehrten Einführung von Enzymimmuntestsystemen. Dieser Schritt wurde von phytochemisch interessierten Wissenschaftlern nur in wenigen Fällen nachvollzogen (WEILER, 1982; DAIE und WYSE, 1982; ATZORN und WEILER, 1983). Ein Grund dafür könnte sein, daß die Eigenschaften des Enzymimmuntests im Vergleich zum Radioimmuntest umstritten waren. Die Nachteile des Radioimmuntests hängen mit der Verwendung radioaktiv markierter Substanzen zusammen. Die Bestimmung von Radioaktivität, insbesondere bei β -Strahlung, ist apparativ anspruchsvoll und zeitaufwendig. Die zur Erlangung der notwendigen Umgangserlaubnisse gestellten Anforderungen behindern die Ausbreitung dieser Technik. Die Vorteile des Enzymimmuntest in der Handhabung wurden kaum bestritten. Unsicherheiten verursachten die denkbaren Störfaktoren bei der Enzymaktivitätsbestimmung und der mögliche Einfluß des großen Enzymmoleküls auf die Antigen-Antikörper-Reaktion (MAGGIO, 1980). Für den Enzymimmuntest wurde eine generell geringere Nachweisempfindlichkeit oder Meßgenauigkeit gegenüber dem Radioimmuntest unterstellt. Einzelne Arbeiten belegten allerdings schon früh, daß dies keine allgemeinverbindliche Regel sein konnte (KITAGAWA und AIKAWA, 1976; BOSCH et al., 1978; GERLICH und STAMM, 1978).

Heute kann gesagt werden, daß bei Verwendung geeigneter Antisera und sorgfältiger Ausarbeitung der Testbedingungen der Enzymimmuntest in seiner Zuverlässigkeit dem Radioimmuntest ebenbürtig ist. Seine Vorteile belegt nicht zuletzt die steigende Zahl kommerziell angebotener Testsysteme für verschiedenste Anwendungen.

Es schien daher erfolgversprechend, ausgehend vom Scopolamin-Radioimmuntest einen Enzymimmuntest zur Erfassung die-

ses Tropanalkaloids in pflanzlichen Materialien zu erproben. Der optimierte Enzymimmunttest wies mit der Nachweisgrenze von 15 pg eine deutlich höhere Empfindlichkeit als der Radioimmunttest auf, in dem bei Verwendung derselben Antikörperfraktion 800 pg gerade noch detektiert werden konnten. Niedrige Werte wurden für die Kreuzreaktivität gegenüber strukturell nah verwandten Tropanalkaloiden wie Hyoscyamin und Atropin mit jeweils 0% oder 6 β -Hydroxyhyoscyamin mit 2,3% gefunden. Im Radioimmunttest betrugen die entsprechenden Werte 0,8%, 0,7% und 10,4%.

Der Enzymimmunttest war für die Bearbeitung pflanzlicher Proben gut geeignet. Die Zuverlässigkeit der beiden Testsysteme war gleich zu beurteilen. Dies zeigte die enge Korrelation der Ergebnisse, wenn Pflanzenextrakte mit beiden Meßmethoden auf ihren Scopolamingehalt untersucht wurden. Nachdem WEILER *et al.* (1981) für den Radioimmunttest die Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen eines gebräuchlichen chromatographischen Verfahrens zeigen konnten, war dies so auch für den Enzymimmunttest gesichert.

Bei der Synthese des notwendigen Hapten-Enzym-Konjugates konnte mit der Norscopolamin-N- β -propionsäure das Scopolaminderivat benutzt werden, das auch zur Herstellung des Immunogens verwendet worden war. Dies verringerte die notwendigen Synthesearbeiten. Auch in einem Sonderfall, nach der Biotransformation radioaktiv markierter Substanzen, konnte der Scopolamingehalt des Pflanzenmaterials gemessen werden, da Radioaktivität das Testverfahren nicht beeinflusste.

Dasselbe Vorgehen lieferte beim Hyoscyamin-Immuntest entgegengesetzte Resultate. Hier zeigte der Enzymimmunttest wesentlich schlechtere Eigenschaften in Bezug auf Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivitäten. Für die Anwendung auf komplexe Stoffgemische mit niedrigen Alkaloidgehalten wie Pflanzenrohextrakte war er damit weniger geeignet. Als Grund dafür mußte angenommen werden, daß im polyklonalen

Hyoscyamin-Antiserum Antikörper vorlagen, die zum proteingebundenen Hapten eine höhere Affinität besaßen als zum freien Hyoscyamin.

Solche störenden Antikörper mittels der Immunaффinitätschromatographie herauszureinigen (CUATRECASAS und ANFENSEN, 1971), ist für niedermolekulare Antigene nicht möglich. Ihre Bindung an eine feste Matrix setzte wiederum eine Derivatisierung voraus, sodaß Antikörper gegen die gebundene Form ebenfalls erfaßt würden. Auch die Anwendung des Konzepts der Heterologie von Brückenmolekül und Verknüpfungsstelle (EXLEY, 1978) verbesserte die Eigenschaften des Hyoscyamin-Enzymimmuntests nicht wesentlich.

Es konnten daher keine allgemeingültigen Aussagen zu den Auswirkungen der unterschiedlichen Markierungen im Radio- und Enzymimmuntest gemacht werden. Die Radioimmuntests für die Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin waren nach den gleichen Prinzipien aufgebaut. Beide zeichneten sich durch hohe Nachweisempfindlichkeit und Spezifität aus. Bei der Entwicklung von Enzymimmuntests unter Verwendung derselben Antiseren wurden jedoch stark voneinander abweichende Ergebnisse erhalten. Nur der Enzymimmuntest für Scopolamin zeigte die angestrebten Charakteristika eines immunologischen Testsystems.

Ein Nachteil vieler immunologischer Bestimmungsverfahren ergibt sich aus der Verwendung polyklonaler Antiseren. Deren charakteristische Eigenschaften wie Spezifität und Affinität wechseln von Versuchstier zu Versuchstier. Einen Ausweg bot die von KÖHLER und MILSTEIN (1975) beschriebene Technik der Produktion monoklonaler Antikörper. Durch Verschmelzung eines immunkompetenten Lymphocyten und einer unbegrenzt lebensfähigen Myelomzelle schufen sie Zelllinien, die Antikörper einer bestimmten Spezifität produzierten. Diese standen damit in praktisch unbegrenzter Menge zur Verfügung. Mit immunologischen Verfahren waren jetzt Untersuchungen mit großen Probenzahlen und über Zeiträume von mehreren Jahren

möglich. Dabei fielen keine aufwendigen Routinearbeiten zur Überprüfung verschiedener Antikörperchargen mehr an.

Ein weiterer Vorteil ist, daß gegen ein Antigen verschiedene monoklonale Antikörper hergestellt werden können. Unter ihnen kann für einen bestimmten Anwendungszweck der bestgeeignete ausgesucht werden. Dies könnte die Selektion eines hochspezifischen Antikörpers für einen Enzymimmuntest erlauben, bei dem freies Antigen in niedrigen Konzentrationen mit proteingebundenem Antigen um die Bindungsstellen konkurrieren kann, auch wenn die im polyklonalen Serum aufscheinende Immunantwort als Summe aller induzierten Antikörper diese Eigenschaft nicht zeigt.

Auffallend ist die geringe Zahl von Veröffentlichungen über monoklonale Antikörper gegen niedermolekulare, pflanzliche Antigene. Eine computergestützte Literaturrecherche im Dezember 1986 erbrachte insgesamt 7 Arbeiten (HUNTER et al., 1982; MERTENS et al., 1983; 1985; COLLIGNON et al., 1984; HORGAN et al., 1984; BUCHMANN et al., 1985; BJERCKE et al., 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, monoklonale Antikörper gegen ein Tropanalkaloid zu gewinnen.

Zur Erzeugung der Immunantwort wurde auf eine bewährte Konjugatstruktur zurückgegriffen. Die Kopplung des Tropanalkaloids an Rinderserumalbumin über eine Propionsäurebrücke am Stickstoffatom hatte die Gewinnung hochspezifischer Antiseren gegen Scopolamin (WEILER et al., 1981b) und Hyoscyamin (diese Arbeit) gestattet. Zur Herstellung des Konjugats wurde Atropin verwendet. Die erhaltenen monoklonalen Antikörper differenzierten nicht zwischen D- und L-Hyoscyamin. Um die Frage zu klären, ob für die Gewinnung stereospezifischer, monoklonaler Antikörper nicht der Einsatz optisch aktiver Immunogene vorzuziehen wäre, bedarf es weiterer Versuche. Inzwischen erhielten MERTENS (1985) und BJERCKE et al. (1986) stereoselektiv bindende monoklonale Antikörper nach Verwendung razemischer Haptenkonjugate. Diese richteten sich jeweils gegen eines der beiden Enantiomere.

Die in der Hybridomtechnik verwendeten Fusionsprotokolle entstanden aus empirischer Erfahrung. Das genaue Verständnis der ablaufenden Vorgänge und aller möglichen Einflußfaktoren fehlt bis heute. Deshalb können in der Literatur recht unterschiedliche Vorschriften und viele Varianten gefunden werden (GEFTER et al., 1977; GALFRE und MILSTEIN, 1981; PETERS et al., 1985).

In dieser Arbeit erwies sich das Protokoll nach GALFRE und MILSTEIN (1981) als erfolgreich, nachdem die Versuchsbedingungen in ihren Einzelheiten an die Gegebenheiten des Labors angepaßt worden waren. Die Ausbeute an wachsenden Kolonien lag mit einer Fusionshäufigkeit von 10^{-6} im Bereich der von GODING (1983) angegebenen Werte von 10^{-5} bis 10^{-7} . Durch die Behandlung der Myelomzellen vor der Fusion mit Colcemid (MIYAHARA et al., 1984) konnte sie nochmals um den Faktor 2-3 gesteigert werden.

Mit der Zahl der wachsenden Kolonien nach der Fusion nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, daß eine Zelllinie mit der erwünschten Antikörperproduktion gefunden werden kann. Neben weiteren Neuerungen im Fusionsprotokoll werden daher andere Wege gesucht, den Fusionserfolg zu sichern. Zellen können im pulsierenden, elektrischen Feld fusioniert werden (ZIMMERMANN, 1982). Diese Technik eignete sich zur Gewinnung monoklonaler Antikörper (LO et al., 1984). Sie fand aber, wohl wegen des apparativen Aufwandes, keine weitere Verbreitung.

Mehrere Arbeitsgruppen machten die Erfahrung, daß die Verwendung verschiedener Myelomzellstämme zu unterschiedlichen Ausbeuten an wachsenden Kolonien führte (HUNTER et al., 1982; MERTENS, 1985). Die vorliegende Arbeit bestätigte diese Beobachtungen. Die Myelomstämme PAI/O und NS-1 lieferten bei gleichen Bedingungen für Anzucht und Fusion bessere Ergebnisse als Sp2/O und X63. Es gilt daher die Empfehlung, den Erfolg bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper mit verschiedenen Zelllinien zu suchen.

Nach einer Fusion müssen diejenigen Klone selektiert werden, die Antikörper der angestrebten Spezifität produzieren. Für haptensspezifische Antikörper wurden in der Vergangenheit neben dem Radioimmunttest mit freien markiertem Antigen (MERTENS, 1985) v.a. Festphasenimmuntests mit radioaktiv markiertem (HUNTER et al., 1982) oder enzymmarkiertem (CHAMAT, 1984) anti-Maus-Ig-Antikörpern durchgeführt.

Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen Atropin wurde ein System entwickelt, das die Bindungsfähigkeit von Protein A gegenüber Immunglobulinen (GODING, 1978) für einen Festphasenimmuntest nutzte. Die Detektion der gesuchten Antikörper erfolgte durch ein enzymmarkiertes Antigen, das Atropin-AP-Konjugat. Diese Nachweismethode hatte gegenüber dem ebenfalls möglichen Radioimmuntest mit ^3H -Atropin den Vorteil einer höheren Empfindlichkeit. Die Antikörper in einer 1:300000-Verdünnung des Hyoscyamin-Antiserums wurden sicher nachgewiesen, während im Radioimmuntest Verdünnungen über 1:2000 nicht mehr erkannt wurden.

Über die notwendige Empfindlichkeit eines Testsystems zum Nachweis monoklonaler Antikörper gibt es sehr unterschiedliche Angaben. Nach GODING (1980) genügt der Nachweis der Antikörper in 0,1 ml einer 1:1000-Verdünnung des Antiserums. Bei PETERS et al. (1985) wird dagegen die Möglichkeit gefordert, haptensspezifische Antikörper in einer 1:40000-Verdünnung des Serums einer immunisierten Maus zu erkennen.

Da zu Beginn dieser Arbeit keinerlei Erfahrungen mit dem Nachweis monoklonaler Antikörper gegen Alkaloide vorlagen, wurde das empfindlichere Testsystem gewählt. Dadurch war der Nachweis der Antikörper zu einem frühen Zeitpunkt nach der Fusion möglich. Dies verringerte die Gefahr, daß die gesuchten Hybridome von anderen Zellen überwachsen werden könnten. Wie bei allen Festphasenimmuntests für Haptene wurde ein Hapten-Protein-Konjugat an Stelle des freien Atropins verwendet. Dies kann dazu führen, daß Antikörper nachgewiesen

werden, die nicht nur das unveränderte Hapten, sondern auch das Trägerprotein binden. Der dadurch notwendige zweite Test zum Nachweis der Verdrängung enzymmarkierten Atropins durch freies Atropin konnte jedoch bei der üblicherweise geringen Anzahl von positiven Hybridomklonen in Kauf genommen werden.

Die Zahl der Klone, die Antikörper mit der erwünschten Spezifität gegen Atropin produzierten, lag zwischen null und zwei pro Fusion, obwohl in Seren der Versuchstiere hohe Antikörpertiter gemessen wurden. Statistische Überlegungen bieten eine Erklärung dafür an. Nach STÄHLI et al. (1980) nimmt die Zahl antigenspezifischer Klone mit der Zahl stimulierter B-Lymphocyten zu. Ein Protein mit einem Molekulargewicht über 50000 Dalton besitzt mehrere antigene Determinanten. Durch sie werden eine ungleich größere Zahl von B-Lymphocyten angeregt als durch ein Hapten wie Atropin mit einem Molekulargewicht von 289 Dalton. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß eine Zelle fusioniert, die spezifische Antikörper gegen das Hapten produziert.

Auf diesen Umstand ist wohl auch zurückzuführen, daß die weitaus größte Zahl der bisher beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen Moleküle mit komplexer Struktur und hohem Molekulargewicht gerichtet ist. Unter den niedermolekularen Antigenen stellen wiederum Substanzen mit einem Steroidgerüst einen großen Anteil (FANTL et al., 1982; KOHEN et al., 1982). Diese wirken nach Kopplung an ein Trägerprotein so stark immunogen, daß sie zur Erprobung neuer Immunisierungstechniken benutzt wurden (BUCHMANN et al., 1985).

Die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Atropin ergab, daß sie alle einer der IgG-Klassen angehörten. Dies war die Folge des verwendeten Immunisierungsprogramms mit mehrmaligen Injektionen im Abstand einiger Wochen. Die Tiere sollten sich in der Phase der sekundären Immunantwort befinden. Die Affinität der Antikörper gegenüber Atropin lag deutlich niedriger als bei den entsprechenden Kaninchenserum. Aus diesem Grund ergab ihr Einsatz im

Hyoscyamin-Immuntest keine hohe Nachweisempfindlichkeit. Zwischen der Affinität und der erreichbaren Nachweisgrenze besteht ein Zusammenhang (COLLIGNON et al., 1984). Um die polyklonalen Antiseren in den immunologischen Bestimmungsverfahren für Atropin oder Hyoscyamin zu ersetzen, müssen besser geeignete Hybridomstämme gefunden werden. Den Weg dorthin könnten die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen.

Eine Anwendung fanden die immunologischen Bestimmungsverfahren bei der Untersuchung herbarisierter Pflanzen auf ihren Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin. Naturgemäß dürfen von Herbarbögen, die stets unersetzlich und in vielen Fällen auch wegen ihres Alters sehr kostbar sind, nur geringe Probenmengen entnommen werden. Dennoch konnten wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit des Hyoscyamin-Radioimmuntests und des Scopolamin-Enzymimmuntests Alkaloidgehalte unter $10^{-4}\%$ vom Trockengewicht bestimmt werden. Damit eigneten sich die Immuntests zur Bearbeitung chemotaxonomischer Fragen. Bevor endgültige Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen gezogen werden, muß allerdings die Bestimmung der Pflanzen kritisch überprüft werden.

Einbezogen wurden 85 Arten aus der Familie der Solanaceen, meist mit Proben von verschiedenen Standorten. Aufgrund der Ergebnisse bildet der Gehalt an Scopolamin und Hyoscyamin ein durchgängiges Merkmal der Gattungen Anthocercis, Anthotroche, Atropa, Datura, Duboisia, Hyoscyamus, Latua, Man-dragora, Methysticodendron, Physochlaina, Przewalskia, Scopolia und Solandra. Auch für Salpichroa organifolia wurde ein Gehalt an Hyoscyamin vermutet (EVANS et al., 1972). Die Untersuchung von neun Proben aus den Arten S. diffusa und S. organifolia bestätigte dies nicht.

Weiterhin wurden Selektionsexperimente an differenzierten Pflanzen durchgeführt. Die immunologischen Bestimmungsverfahren eigneten sich für diesen Zweck. In Populationen von Atropa belladonna, Datura stramonium und Duboisia-Hybriden fanden sich einzelne Pflanzen mit erhöhtem Alkaloidgehalt.

Diese könnten die Grundlage für die weitere Selektion bilden. Wegen der großen Unterschiede im Scopolamingehalt erschien es unwahrscheinlich, daß ausgewählte Rassen der beiden erstgenannten Arten in Konkurrenz zu Duboisia treten könnten.

Für den Erfolg einer Züchtung ist nicht nur die genetische Disposition einer Pflanze zu hohen Alkaloidgehalten notwendig. Wirtschaftliche Überlegungen finden ihre Basis in den Hektarerträgen. Beachtung verdienen daher auch äußere Bedingungen mit Einfluß auf die Alkaloidausbeute wie Klima, Bodenbeschaffenheit, Düngung und die Wahl des Erntezeitpunktes. Mittels der immunologischen Analytik können die Bedeutung solcher Faktoren untersucht und optimale Anbaubedingungen festgelegt werden.

Die Bildung von Hyoscyamin und Scopolamin in pflanzlichen Zellkulturen wurde an einer Reihe von Solanaceen-Arten untersucht (Übersicht bei KURZ und CONSTABEL, 1985). Die Alkaloidgehalte lagen durchwegs sehr niedrig, häufig konnten alle Tropanalkaloide oder einzelne Vertreter nicht nachgewiesen werden. Aus Zellkulturen regenerierte differenzierte Gewebe und intakte Pflanzen wiesen das normale Alkaloidspektrum auf (RAJ BHANDARY et al., 1969; TABATA et al., 1972; HIRAOKA und TABATA, 1974). Diese Ergebnisse führten zu der Ansicht, die Bildung dieser Tropanalkaloide sei an Differenzierungsvorgänge der Zellen gekoppelt. Dem standen die geringen, aber sicher nachweisbaren Alkaloidgehalte in einigen Zellkulturen und die z.T. nicht nachweisbare Abhängigkeit zwischen Alkaloidgehalt und Differenzierungserscheinungen entgegen (KIBLER und NEUMANN, 1979; OKSMANN-CALDENTY und STRAUSS, 1986).

Bisher ist keine Zellkultur bekannt geworden, die Tropanalkaloide in einem Ausmaß bildete, das dem in der intakten Pflanze vergleichbar wäre. Zwar gelang es, durch Selektion chemischer Varianten eine Kalluskultur von Hyoscyamus niger mit einem Scopolamingehalt von 0,69% vom Trockengewicht zu

Pflanze	Kultur	Alkaloidgehalt				TG (g/l)	WI	Literatur
		Scop. (mg / l)	Hyosc. (% TG)	Scop.	Hyosc.			
Atropa belladonna	W	20	50	--	--	--	--	HARTMANN <u>et al.</u> , 1986
	Z	--	--	0	Spuren	--	--	
Datura stramonium	W	--	--	0,04	0,19	0,57	--	GUPTA und GIBSON, 1972
	Z	--	--	0 (unter 0,01%)	0	11	8,2	STABA und JINDRA, 1968
Datura innoxia	Z	1,6	0,03	0,01	0,0003	11	27	KIBLER und NEUMANN, 1979
Duboisia leichhartii	W	40	15	0,37	0,16	7,1	--	YAMADA und
	K	--	--	0 (unter 0,0005%)	0	--	--	ENDO, 1984
Duboisia Hybride	Z	--	--	0 (unter 0,00001%)	0	14	10	diese Arbeit
Hyoscyamus albus	W	--	--	0,1	1,1	--	--	HASHIMOTO <u>et al.</u> , 1986
Hyoscyamus niger	W	5,6	--	0,2	--	2,8	--	METZ und LANG, 1964
	W	7,6	0,8	0,2	0,02	3,9	7,5	HASHIMOTO und
	Z	0,4	2,8	0,003	0,02	14	6,7	YAMADA, 1983
	W	65	24	0,46	0,17	14	14	diese Arbeit
	K	--	--	0,000045	0,00003	--	--	diese Arbeit

Tab. 37: Verschiedene Kulturen und ihre Produktion der Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin.
K: Kalluskultur Z: Zellsuspensionskultur
W: Wurzelkultur

$$\text{Wachstumsindex WI} = \frac{\text{TG bei Ernte}}{\text{TG Inoculum}}$$

finden. Der Scopolamingehalt dieser und ähnlicher Varianten fiel aber im Laufe einiger Kultivierungsperioden auf das Niveau der unselektierten Kultur zurück (10^{-5} - 10^{-6} % TG) (FANKHAUSER et al., 1986). Ein besonders rascher Rückgang des Alkaloidgehaltes wurde in Suspensionskultur beobachtet.

Deutlich günstigere Ergebnisse wurden bei der Kultivierung von differenziertem Wurzelmaterial verschiedener Solanaceen-Arten erzielt. Die Tabelle 37 vergleicht einige Merkmale dieser Kulturen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 32 Wurzelkulturen von 15 Solanaceen-Arten auf ihren Gehalt an Tropanalkaloiden untersucht. Für jede Art wurden Scopolamin und Hyoscyamin als Inhaltsstoff einer Wurzelkultur nachgewiesen. Die Höhe der Gehalte und das Verhältnis der beiden Alkaloide variierte. Die in der intakten Pflanze gefundenen Werte wurden von Hyoscyamus-Wurzelkulturen meist übertroffen.

Mit den immunologischen Untersuchungsverfahren wurde die Verteilung der Alkaloidgehalte in den Wurzeln intakter Pflanzen verschiedener Solanaceen-Arten untersucht. Dabei fanden sich in den einzelnen Teilen der Wurzeln einer Pflanze stark unterschiedliche Werte. Ihre Variationsbreite für die einzelne Pflanze übertraf die Auswirkungen möglicher Fehlerquellen der Testsysteme. Für diese Unterschiede wurden zwei Ursachen vermutet. Die einzelnen Wurzeln könnten sich wegen ihres Alters, ihrer Lage im Boden oder ihrer Bedeutung für die Pflanze in unterschiedlichem physiologischen Zustand befinden, oder die unterschiedlichen Werte wären Ausdruck somaklonaler Variation in Bezug auf den Alkaloidgehalt.

Durch Messungen an der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger konnten diese Fragen genauer untersucht werden. Auf der einen Seite fanden sich Zusammenhänge zwischen Alkaloidgehalt und Entwicklungszustand des Wurzelmaterials. Hier waren die unterschiedlichen Alkaloidgehalte von Haupt- und Seitenwurzeln in einer Kultur sowie von frisch nachgewachsenen und älteren Wurzelteilen einzuordnen. Daneben wurde durch die

unterschiedlichen Alkaloidgehalte in Wurzelkulturen, die aus einzelnen Wurzelstücken unter identischen Bedingungen angezogen wurden, somaklonale Variation in Bezug auf dieses Merkmal nachgewiesen.

Der deutlich geringere Alkaloidgehalt jüngerer Gewebeteile sowie der Verlauf von Wachstum und Alkaloidgehalt in der Kultur belegten einen zeitlichen Abstand von Wachstum und Alkaloidbildung. SOLT et al. (1960) beschrieben ähnliche Verhältnisse anhand der Anabasinproduktion in Nicotiana glauca-Wurzelkulturen. Für Nikotin wiesen sie dagegen in dieser Kultur die gleichzeitige Zunahme von Trockengewicht und Alkaloidgehalt nach.

Der Begriff der somaklonalen Variation wurde von LARKIN und SNOWCROFT (1981) geprägt, weil sich aus pflanzlichen Zellkulturen regenerierte Pflanzen in ihren Eigenschaften häufig stark unterschieden. Die Beobachtung, daß Subkulturen aus einer pflanzlichen Zellkultur in ihren Eigenschaften nicht identisch waren, wurde ebenfalls mit somaklonaler Variation bezeichnet. Eine Nutzanwendung dieses Phänomens war die Selektion von Zellkulturstämmen mit einer Überproduktion erwünschter Sekundärmetaboliten. Hierfür wurden Subkulturen angelegt, die sich aus einer einzigen Zelle entwickelten (TABATA und HIRAOKA, 1976; DOUGALL et al., 1980; OKSMANN-CALDENTY und STRAUSS, 1986). In anderen Fällen waren auch Zellaggregate der Ursprung für die varianten Zellstämme (ZENK et al., 1977; SATO und YAMADA, 1984).

Dieses Konzept wurde auf die untersuchte Wurzelkultur von Hyoscyamus niger übertragen. Es ermöglichte die Selektion von Wurzelstämmen mit erhöhtem Scopolamingehalt. Nach der Festlegung optimaler Kulturbedingungen konnten in der Wurzelkultur 14 g/l Trockengewicht, 65 mg/l Scopolamin und 24 mg/l Hyoscyamin erreicht werden. Die Wurzelkultur ließ sich über einen Zeitraum von nahezu drei Jahren kultivieren, wobei kein Anzeichen auf eine begrenzte Lebensdauer hinwies. Auch die Werte für den Gehalt an den Tropanalkaloiden fie-

len nicht, wie an Zellsuspensionskulturen beobachtet, auf sehr niedrige Werte ab.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Vorgehen, das die anfängliche Auswahl von geeignetem pflanzlichen Material, die Optimierung der Kulturbedingungen und die Selektion varianter Stämme mit einer leistungsfähigen Analytik vereinigte, könnte auch benutzt werden, um die kommerzielle Produktion von Tropanalkaloiden in einer Wurzelkultur anzugehen. Bisher liegen keine Erfahrungen mit Kulturen dieser Art vor, die über den Labormaßstab hinausgingen. Über Kosten und Möglichkeiten kann daher nur spekuliert werden.

Häufig wurde an Wurzelkulturen ein relativ langsames Wachstum im Vergleich zu pflanzlichen Zellkulturen beobachtet. Schon bei diesen gilt aber die langsame Zunahme an Biomasse im Vergleich zur Fermentation von Mikroorganismen als eine der Hauptschwierigkeiten für die biotechnologische Nutzung. In Hinblick auf die Produktion von Pflanzeninhaltsstoffen wurden in letzter Zeit Wurzelkulturen bearbeitet, die durch die Transformation pflanzlicher Zellen mit Agrobacterium rhizogenes entstanden waren. Sie sollen sich durch günstige Wachstumseigenschaften auszeichnen. Entsprechende Versuche wurden mit verschiedenen Solanaceen-Arten wie Atropa bella-donna , Scopolia japonica, Datura innoxia und Hyoscyamus muticus (FLORES und FILNER, 1985; KAMADA et al., 1986; MANO et al., 1986; SHIMOMURA et al., 1986) durchgeführt. NABESHI-MA et al. (1986) optimierten für eine dieser Kulturen Mediumzusammensetzung und Versuchsbedingungen, um die Scopolaminproduktion zu steigern. Das Ergebnis nach vierwöchiger Kultivierung und einen Medienwechsel nach drei Wochen waren 8 g/l Trockengewicht und ein Scopolamingehalt von 11,2 mg/l. Die Werte lagen damit niedriger als bei der in dieser Arbeit vorgestellten Wurzelkultur von Hyoscyamus niger. Für die übrigen Kulturen wurden keine entsprechenden Daten angegeben, die eine Beurteilung der Scopolaminsausbeuten erlaubten. Die Zukunft wird zeigen, ob Wurzelkulturen eine wirtschaftlich vertretbare Möglichkeit sein können, pflanzliche In-

haltsstoffe zu produzieren, und ob die Transformation durch Agrobacterium rhizogenes Wurzelkulturen mit überlegenen Eigenschaften begründen kann.

Die Lokalisierung der Biosynthese der Tropanalkaloide in der Pflanze wurde mit Hilfe von Pfropfungsversuchen an alkaloidhaltigen und -freien Solanaceen-Pflanzen untersucht (Übersicht bei ROMEIKE, 1960a). Danach gilt die Auffassung, daß Tropanalkaloide im wesentlichen in der Wurzel der Pflanzen gebildet würden. Die Epoxidierung von Hyoscyamin zu Scopolamin fände dann in den oberirdischen Pflanzenteilen statt (LUCKNER und DIETRICH, 1984).

In der vorliegenden Arbeit unterstützten die Ergebnisse der Versuche zur Biotransformation von ^{14}C -Hyoscyamin in Duboisia-Triebspitzen diese Hypothese. Sie zeigten, daß auch bei dieser Spezies in den grünen Pflanzenteilen das Enzymsystem zur Umwandlung von Hyoscyamin in 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin vorhanden war. Damit wurden die Schlußfolgerungen von KITAMURA et al. (1985) entkräftet, die nach Versuchen mit Duboisia myoporoides nur der Wurzel, nicht dem Blatt eine Rolle bei der Biosynthese der Tropanalkaloide zuschrieben.

Die Fähigkeiten der Wurzel unterstrich dagegen die Beobachtung, daß sich neben Hyoscyamin in allen untersuchten Wurzelkulturen Scopolamin nachweisen ließ. In vielen Fällen machte es einen großen Teil des Gesamtgehaltes an Tropanalkaloiden aus. Entgegen der oben zitierten Hypothese war also differenziertes Wurzelgewebe zur Biosynthese von Scopolamin befähigt. Somit widersprachen sich die Ergebnisse von Pfropfungsversuchen und Messungen an Wurzelkulturen. Bei der Bewertung ist sicherlich zu beachten, daß Wurzelkulturen möglicherweise kein echtes Abbild der Verhältnisse in der intakten Pflanze liefern. Diese Einschränkung muß aber auch für Propflinge gemacht werden, die aus den Teilen zweier Pflanzen verschiedener Artzugehörigkeit bestehen.

An Hyoscyamus niger konnte der Verlauf der Scopolaminbiosyn-

these mit Hyoscyamin als Vorstufe und 6 β -Hydroxyhyoscyamin als Zwischenprodukt nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde durch die in vivo-Umsetzung von ^{14}C -Hyoscyamin und ^{14}C -6 β -Hydroxyhyoscyamin geführt. Die hohen Einbauraten, die alle bisherigen Ergebnisse ähnlicher Versuche übertrafen, schlossen andere Interpretationen aus. Das entsprechende Biosyntheseschema wurde von ROMEIKE (1960a; 1960b) nach Versuchen mit Datura vorgeschlagen. Die Ergebnisse späterer Versuche an Duboisia bestätigten Hyoscyamin als biosynthetische Vorstufe von 6 β -Hydroxyhyoscyamin und Scopolamin (GRIFFIN, 1979; LUANRATANA und GRIFFIN, 1982). Der Einbau radioaktiv markierten 6 β -Hydroxyhyoscyamins in Scopolamin wird in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. ROMEIKE (1960b) hatte die entsprechenden Versuche mit unmarkierten Substanzen und Reisern der alkaloidfreien Propfkombination Datura ferox auf Cyphomandra betacea durchgeführt.

Beim Versuch der Biokonversion von ^{14}C -Scopolamin in der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur wurde kein Einbau in Hyoscyamin oder in 6 β -Hydroxyhyoscyamin gefunden. Bei der Biotransformation von ^{14}C -Methyl,6 β ,7 β - $^3\text{H}_2$ -hyoscyamin zu 6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde nur eines der beiden Tritium-Atome ausgebaut. Diese Ergebnisse wiesen nach, daß eine Umwandlung von Scopolamin in Hyoscyamin mit 6 β -Hydroxyhyoscyamin als Zwischenprodukt in der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur nicht stattfand. Dies wurde von VERZAR-PETRI et al. (1974) für Datura innoxia beschrieben.

Das Intermediat 6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde historisch zuerst als Syntheseprodukt (FODOR und KOVACS, 1953), dann als natürlicher Inhaltsstoff von Datura beschrieben (ROMEIKE, 1962). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Alkaloid aus Duboisia isoliert und außerdem nach FODOR et al. (1962) synthetisiert. Seine ^1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektren wurden aufgenommen. Die Anwendung moderner Meßmethoden und die zweidimensionale Darstellung des ^1H -Spektrums ermöglichten erstmals für ein Tropanalkaloid, jedem nichtaromatischen H-Atom sein entsprechendes Signal zuzuordnen. Im Anschluß

konnte durch ein ^1H , ^{13}C -korreliertes Spektrum die Beziehung zwischen den Signalen des ^{13}C -Spektrums und den C-Atomen in der Strukturformel hergestellt werden.

Weitere Versuche galten der möglichen Rolle von Dehydrohyoscyamin in der Scopolaminbiosynthese. Auch mit der Kapillargaschromatographie als sehr empfindlicher Analysenmethode gelang der Nachweis von Dehydrohyoscyamin als Inhaltsstoff des Wurzelmaterials der Hyoscyamus niger-Kultur nicht. Für Atropa belladonna wiesen HARTMANN *et al.* (1986) 13 Alkaloide mit zum Teil sehr niedrigen Gehalten nach, darunter jedoch ebenfalls kein Dehydrohyoscyamin. Die *in vivo*-Transformationsversuche mit radioaktiv markierten Alkaloiden an der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur ergaben ebenfalls keinen Nachweis für das Auftreten von Dehydrohyoscyamin. Damit blieb die mögliche Bedeutung dieses Alkaloids in der Scopolaminbiosynthese ungeklärt. Die Rolle als Zwischenprodukt bei der Bildung von 6 β -Hydroxyhyoscyamin aus Hyoscyamin, wie sie WALLER und NOWACKI (1978) vorgeschlagen haben, kann es wohl nicht einnehmen. Dem widersprachen die Ergebnisse der Biotransformation von ^{14}C -Methyl, 6 β , 7 β - $^3\text{H}_2$ -hyoscyamin in Duboisia und die Beschreibung der Hyoscyamin-6 β -hydroxylase (HASHIMOTO und YAMADA, 1986).

Andererseits läßt sich in Einklang mit allen bisherigen Ergebnissen ein Biosyntheseschema formulieren, das Dehydrohyoscyamin als Intermediat bei der Entstehung von Scopolamin aus 6 β -Hydroxyhyoscyamin gelten läßt. Dies berücksichtigte den Umbau von Dehydrohyoscyamin in Scopolamin, der sowohl in alkaloidfreien Trieben von Datura ferox (FODOR *et al.*, 1959) als auch in dieser Arbeit in der Hyoscyamus niger-Wurzelkultur beobachtet wurde. Auch die ersten Ergebnisse der Untersuchung dieser Fragen auf der Ebene zellfreier, enzymatischer Umsetzungen brachten keine Klarheit. Eine Proteinfraction katalysierte nach den Angaben von YAMADA *et al.* (1986) sowohl die Umsetzung von Hyoscyamin zu 6 β -Hydroxyhyoscyamin als auch die von Dehydrohyoscyamin zu Scopolamin. An der

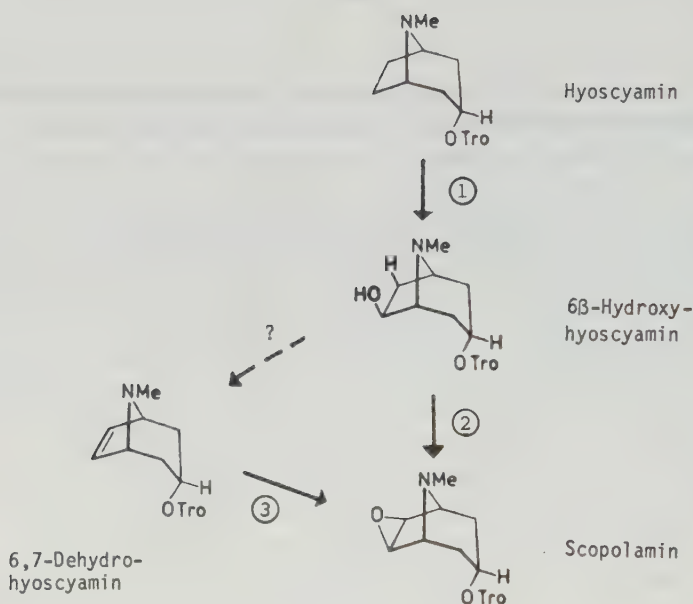


Abb. 64: Vorstellungen zur Biosynthese von Scopolamin. Die Reaktionen 1, 2 und 3 wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Hyoscyamus niger-Wurzelkultur durch die Ergebnisse der Biokonversionsversuche nachgewiesen. Die Reaktion 1 wird durch die Hyoscyamin-6β-hydroxylase katalysiert, die HASHIMOTO und YAMADA (1986) beschrieben.

hier vorgestellten Wurzelkultur von Hyoscyamus niger konnte nur die erstgenannte Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Zweifellos müssen weitere Arbeiten mit gereinigten Enzympräparationen erfolgen, um offene Fragen in Zusammenhang mit der Biosynthese der Tropanalkaloide zu klären. Ob sich aus zukünftigen Ergebnissen eine nutzbare Möglichkeit ergeben wird, Scopolamin durch ein biotechnologisches Verfahren zu gewinnen, kann heute noch nicht abgeschätzt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Radioimmuntest zur Bestimmung des Tropanalkaloids Hyoscyamin in pflanzlichen Materialien wurde entwickelt. Das Testsystem zeichnete sich durch seine Spezifität für L-Hyoscyamin, seine niedrige Nachweisgrenze von 10 pg und seine Präzision aus (Variabilität innerhalb eines Tests 4,5%, zwischen den Tests 9,4%). Es war zur Bestimmung des Alkaloidgehalts in ungereinigten pflanzlichen Rohextrakten geeignet. Pro Person und Tag ermöglichte der Test die Bestimmung mehrerer hundert Proben.
2. Zur Herstellung des Immunogens wurde Hyoscyamin am Stickstoff demethyliert und durch nucleophile Addition an Acrylsäure funktionalisiert. Die freien Carboxylgruppen erlaubten die Kopplung an Rinderserumalbumin. Die erzeugten Antiseren besaßen hohe Affinitätskonstanten von $9,8 \times 10^9$ l/mol und $1,9 \times 10^9$ l/mol.
3. Als radioaktiv markiertes Antigen wurde ^3H -Hyoscyamin eingesetzt, das durch Methylierung von Norhyoscyamin mit ^3H -Methyliodid dargestellt wurde. Seine spezifische Aktivität betrug 3,15 TBq/mmol (= 85 Ci/mmol). Durch dieselbe Reaktionsfolge wurde auch ^{14}C -Hyoscyamin für Biokonversionsversuche mit einer spezifischen Aktivität von 2,13 GBq/mmol (= 58 mCi/mmol) synthetisiert.
4. Unter Verwendung eines Antiserums aus einem erprobten Radioimmuntest wurde ein Scopolamin-Enzymimmuntest entwickelt. Als markiertes Antigen wurde zu diesem Zweck ein Konjugat von Scopolamin und alkalischer Phosphatase verwendet. In Radio- und Enzymimmuntest gemessene Werte für den Scopolamingehalt pflanzlicher Proben korrelierten sehr gut. Der Enzymimmuntest übertraf in seiner Nachweisempfindlichkeit (15 pg gegenüber 800 pg) und seiner Spezifität den Radioimmuntest und kam diesem in seiner Prä-

zision sehr nahe (Variabilität in einem Tests: 5,5% gegenüber 4,1%; zwischen den Tests: 12% gegenüber 10%).

5. Das beim Scopolamin-Enzymimmuntest beschriebene Vorgehen wurde auf die Entwicklung eines Hyoscyamin-Enzymimmuntests übertragen. Dieser war dem Hyoscyamin-Radioimmuntest bezüglich der Nachweisempfindlichkeit (200 ng gegenüber 0,01 ng) und der Spezifität unterlegen.
6. Durch die Fusion von Milzzellen immunisierter Mäuse und Myelomzellen der Linie PAI/0 wurden Hybridomzellen geschaffen, die monoklonale Antikörper mit spezifischer Bindungsfähigkeit für das Tropanalkaloid Atropin produzierten. Die Antikörper gehörten zu den IgG-Subklassen, ihre Affinität lag niedriger als bei den entsprechenden polyklonalen Antiseren. Die Einwirkung von Colcemid auf die Myelomzellen erhöhte die Ausbeute an teilungsfähigen Fusionsprodukten. Als Immunogen wurde das Kopplungsprodukt von Noratropin-N- β -propionsäure an Rinderserumalbumin verwendet. Zum Nachweis der haptenspezifischen Antikörper wurde ein hochempfindlicher Festphasen-Enzymimmuntest entwickelt. Er erlaubte die Selektion der erwünschten Hybridomzellen wenige Tage nach der Fusion.
7. Durch die Anwendung der immunologischen Bestimmungsverfahren auf die Untersuchung von 241 herbarisierten Pflanzen aus 85 Arten wurde der Gehalt an Hyoscyamin und Scopolamin als Merkmal von 13 Solanaceen-Gattungen nachgewiesen. Für die Gattung Salpichroa, bei der ein Hyoscyamingehalt vermutet worden war, wurde dies auf der Basis der sehr niedrigen Nachweisgrenze ausgeschlossen.
8. Die Eignung der immunologischen Bestimmungsverfahren für die Selektion von tropanalkaloidhaltigen Pflanzen wurde gezeigt. In Populationen von Atropa belladonna, Datura stramonium und Duboisia-Hybriden fanden sich Pflanzen mit stark divergierenden Alkaloidgehalten.

9. Die Untersuchung von Kallus- und Zellsuspensionskulturen verschiedener Solanaceen-Arten ergab sehr niedrige oder nicht nachweisbare Gehalte an Hyoscamin und Scopolamin. Im Vergleich dazu wurden bei Messungen an Wurzelkulturen von Solanaceen-Arten höhere Alkaloidgehalte gefunden. Wurzelkulturen aller untersuchten Arten enthielten Hyoscyamin und Scopolamin. Differenziertes Wurzelmaterial ist also zur Biosynthese der genannten Alkaloide befähigt.
10. Durch wiederholte Messungen an einer Wurzelkultur von Hyoscyamus niger wurde somaklonale Variation in Bezug auf den Alkaloidgehalt zwischen einzelnen Wurzelstämmen nachgewiesen. Mehrfache Selektion und die Ausarbeitung optimaler Kulturbedingungen führten zu einer Wurzelkultur mit relativ hoher Scopolaminproduktion (65 mg/l).
11. Die Scopolaminbiosynthese in der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger wurde anhand von in vivo-Umsetzungen radioaktiv markierter Alkaloide untersucht. Die Ergebnisse standen in Einklang mit der vorgeschlagenen Rolle von Hyoscyamin als biosynthetischer Vorstufe von Scopolamin. 6 β -Hydroxyhyoscyamin wurde als Intermediat dieser Reaktionsfolge bestätigt. Dieses Alkaloid wurde aus Duboisia isoliert. Die Verwendung moderner Meßmethoden erlaubte die eingehende Interpretation seiner Kernresonanzspektren (^1H und ^{13}C).
14. Aus der Wurzelkultur von Hyoscyamus niger ließ sich die Hyoscyamin-6 β -hydroxylase, ein bereits beschriebenes Enzym der Scopolaminbiosynthese, nachweisen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AHMAD, A., LEETE, E.: Biosynthesis of the Tropane Moiety of Hyoscyamine from δ -N-Methylornithine. *Phytochemistry* 9 (1970) 2345 - 2347.
- ALFERMANN, A.W., SCHWANTAG, D., MORITZ, S., REINHARD, E.: Biotransformation of β -Methyldigitoxin by Cell Cultures of *Digitalis lanata*. In: Third European Congress on Biotechnology, Vol. I, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1984) 157.
- ANDREWS, P.: Estimation of the Molecular Weight of Proteins by Sephadex Gelfiltration. *Biochem. J.* 91 (1964) 222- 233.
- ANDREWS, P.: The Gelfiltration Behaviour of Proteins Related to Their Molecular Weight Over a Wide Range. *Biochem. J.* 96 (1965) 595 - 606.
- ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radio-immunoassay for the Determination of the Indole Alkaloids Ajmalicine and Serpentine in Plants. *Planta Med.* 34 (1978) 37 - 46.
- ARENS, H., ZENK, M.H.: Radioimmunttests für die Bestimmung von Lysergsäure und einfachen Lysergsäurederivaten. *Planta Med.* 39 (1980) 336 - 347.
- ATZORN, R., WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Formation and Distribution of Sennosides in *Cassia angustifolia*, as Determined by a Sensitive and Specific Radioimmunoassay. *Planta Med.* 41 (1981) 1 - 14.
- ATZORN, R., WEILER, E.W.: The Immunoassay of Gibberellins. 2. Quantitation of GA_3 , GA_4 and GA_7 by Ultrasensitive Solidphase Enzyme Immunoassays. *Planta* 159 (1983) 7 - 11.
- AUTERHOFF, H., KOVAR, K.-A.: Identifizierung von Arzneistoffen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (1981).
- BANHOLZER, R., SCHULZ, W., ZEILE, K.: German Offen. 1, 912, 563 (Cl. C 07d) (1969) .
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Protein in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 70 (1976) 241 - 250.

- BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Recent Studies on Insulin-Binding Antibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82 (1959) 338 - 344.
- BERTHOLDT, H., PFLEGER, R., SCHULZ, W.: Azoniaspiro Compounds. II. Preparation of Esterified Azoniaspiro Compounds of Nor-tropan-3 α - and 3 β -ol. *Arzneim. Forsch.* 17 (1967) 719 - 726.
- BJERCKE, R.J., COOK, G., RYCHLIK, N., GJIKA, H.B., VAN VUNAKIS, LANGONE, J. J.: Stereospecific Monoclonal Antibodies to Nicotine and Cotinine and their Use in Enzyme-linked Immunosorbent Assays. *J. Immunol. Meth.* 90 (1986) 203-213.
- BODENDORF, K., KUMMER, H.: Über die Alkaloide in Latua venenosa. *Pharm. Zentralh.* 101 (1962) 620 - 622.
- BOSCH, A.M.G., VAN HELL, H., BRANDS, J., SCHUURS, A.H.W.M.: Specificity, Sensitivity and Reproducibility of Enzyme-Immunoassays. In: Enzyme Labelled Immunoassay of Hormones and Drugs. Pal, S.B. (ed.) Walter de Gruyter Berlin New York (1978) 175 - 187.
- BOTHNER-BY, A.A., SCHUTZ, R.S., DAWSON, R.F., SOLT, M.L.: Asym. Incorporation of Isotopic Label in the Biogenesis of Hyoscyamine. *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 52 - 54.
- BRADFORD, M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Mikrogramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248 - 254.
- BUCHMANN, D., MILLER, D., KOCH, G.: Monoclonal Antibodies to Digoxin: Comparison of in vitro and in vivo Immunization. *Hybridoma* 4 (1985) 173 - 177.
- BURTON, W.G.: The Potato. H. Veenman and Zonen N.V., Wageningen Holland (1967).
- BUTCHER, D.N., STREET, H.E.: Excised Root Culture. *Bot. Rev.* 30 (1964) 513 - 586.
- BUTT, W.R. (ed.): Practical Immunoassay. The State of the Art. Marcel Dekker Inc. New York Basel (1984).
- CAIRO VALERO, G., DE BUDOWSKI, J., DELLE MONACHE, F., MARINI-BETTOLO, G.B.: New Psychoactive Drug: Heisteria olivae (Olacaceae). *Atti Accad. Naz. Lincei, Rend., Cl. Sci. Fis., Mat. Nat.* 62 (1977) 363 - 364.

- CARR, F.H., REYNOLDS, W.C.: Nor-hyoscyamine and Nor-atropine; Alkaloids Occurring in Various Solanaceous Plants. J. Chem. Soc. 101 (1912) 946 - 958.
- CEKAN, Z.: Assessment of Reliability of Steroid Radioimmunoassays. J. Steroid. Biochem. 6 (1975) 271 - 275.
- CHAMAT, S., HOEBEKE, J., STROSBERG, A.D.: Monoclonal Antibodies Specific for β -Adrenergic Ligands. J. Immunol. 133 (1984) 1547 -1552.
- CHARD, T.: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Scientific Publication Company Amsterdam 6 (1978).
- CHARD, T., MARTIN, M., LANDON, J.: Separation of Antibody Bound From Free Peptides Using Ammonium Sulphate and Ethanol. In: Radioimmunoassay Methods. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.) Edinburgh and London (1971) 257-265.
- CHILTON, M.-D., TEPFER, D.A., PETIT, A., DAVID, C., CASSE-DELBART, F., TEMPE, J.: Agrobacterium rhizogenes Inserts t-DNA into the Genomes of the Host Plant Root Cells. Nature 295 (1982) 432 - 434.
- CLARKE, R.L.: The Tropane Alkaloids. In: The Alkaloids, Vol. XVI. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press New York (1977) 84 - 180.
- COLLIGNON, A., EDELMANN, L., SCHERMANN, J.M.: A Comparative Study Between Animals and Monoclonal Anti-Digoxin Antibodies. Int. J. Nucl. Med. Biol. 11 (1984) 97 - 101.
- CONG, P.-Z.: Study on the Mass Spectrometry of Tropine Ester Alkaloids. Acta Chim. Sin. 39 (1981) 75 - 82.
- CORDELL, G.A.: Introduction to Alkaloids - A Biogenetic Approach. John Wiley & Sons New York Chichester Brisbane Toronto (1981).
- CORDUAN, G.: Produktion von Tropanalkaloiden in Gewebekulturen. Planta Med. Suppl. (1975) 225 - 231.
- CROMWELL, B.T.: Studies on the Synthesis of Hyoscyamine in Atropa belladonna L. and Datura stramonium L. Biochem. J. 37 (1943) 717 - 722.

- CUATRECASAS, P., ANFINSEN, C.B.: Affinity Chromatography. Meth. Enzym. 22 (1971) 345 - 378.
- DAIE, J., WYSE, R.: Adaption of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to the Quantitative Analysis of Abscissic Acid. Anal. Biochem. 119 (1982) 365 - 371.
- DORNREITER, I.: Monoklonale Antikörper gegen Katalase aus Papaver somniferum und Berberinsynthese aus Berberis stolonifera Zellkultur. Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität München (1985).
- DOUGALL, D.K., JOHNSON, J.M., WHITTEN, G.H.: A Clonal Analysis of Anthocyanin Accumulation by Cell Cultures of Wild Carrot. Planta 149 (1980) 292 - 297.
- EHRESMANN, B., IMBAULT, P., WEIL, I.H.: Spectrophotometric Determination of Protein Concentration in Cell Extracts Containing tRNA's and rRNA's. Anal. Biochem. 54 (1973) 454 - 463.
- EHRHARDT, G., RUSCHIG, W.: Arzneimittel - Entwicklung, Wirkung, Darstellung. Band 2. Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1972) 100.
- ENGVAL, E., PERLMANN, P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Quantitative Assay of Immunoglobulin G. Immunochemistry 8 (1971) 871 - 874.
- EVANS, W.C.: Tropane Alkaloids of the Solanaceae. In: The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (eds.) Academic Press London (1979) 241 - 254.
- EVANS, W.C., GHANI, A., WOOLEY, V.A.: Alkaloids of Salpichroa origanifolia. Phytochemistry 11 (1972) 469.
- EXLEY, D.: The Influence of Heterology and Homology on Enzyme Immunoassay. In: Immunoassay of Hormones and Drugs. Pal, S.B. (ed.) Walter de Gruyter Berlin New York (1978) 207 - 219.
- FANKHAUSER, H., OKSMANN-CALDENTY, K.-M., STRAUSS, A.: Instability of Scopolamine Production in Cell Cultures of Hyoscyamus muticus. In: Abstracts of VI. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., Green, C.E. (eds.) Minneapolis (1986) 197.

- FANTL, V.E., WANG, D.Y., KNYBA, R.E.: The Production of High Affinity Monoclonal Antibodies to Progesterone. *J. Steroid Biochem.* 17 (1982) 125 - 130.
- FASTH, A., SOLLENBERG, J., SÖRBO, B.: Production and Characterization of Antibodies to Atropine. *Acta Pharm. Suec.* 12 (1975) 311 - 322.
- FELDMANN, H., RODBARD, D.: Mathematical Theory of Radioimmunoassays. In: Principles of Competitive Protein Binding Assays. Odell, W.P., Daughaday, W.W. (eds.) Philadelphia (1971) 57.
- FLORES, H.E., FILNER, P. Metabolic Relationships of Putrescine, GABA and Alkaloids in Cell and Root Cultures of *Solanaceae*. In: Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. Neumann, K.H., Barz, W., Reinhard, E. (eds.) Springer Berlin Heidelberg (1985) 174 - 185.
- FLORES, H.E., HOY, M.W., PICKARD, J.J.: Production of Secondary Metabolites by Normal and Transformed Root Cultures. In: VI. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P., Green, C.E. (eds.) Minneapolis (1986) 117.
- FODOR, G.: The Tropane Alkaloids. In: The Alkaloids, Vol. VI. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press New York London (1960) 145 - 177.
- FODOR, G.: The Tropane Alkaloids. In: The Alkaloids. Vol. IX. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press New York London (1967) 269 - 303.
- FODOR, G., JANZSO, G., ÖTVÖS, L., BANF, D.: Synthese von S(-)-Hyoscyamin-[methyl-14C]. *Chem. Ber.* 93 (1960) 2681-2685.
- FODOR, G., KOCZOR, I., JANZSO, G.: Die Halbsynthese des 6-Hydroxi-hyoscyamins. *Arch. Pharm.* 295 (1962) 91 - 95.
- FODOR, G., KOVACS, Ö., MESZAROS, L.: The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part III. The Configuration of Scopolamine and of Valeroidine. *J. Chem. Soc. (London)* (1953) 2341 - 2344.
- FODOR, G., NADOR, K.: The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part I. The Configuration of Tropine and Pseudotropine. *J. Chem. Soc. (London)* (1953) 721 - 723.

- FODOR, G., ROMEIKE, A., JANZSO, G., KOCZOR, I.: Epoxidation in vivo with Dehydrohyoscyamine and Related Compounds. Tetrahedron Lett. 7 (1959) 19 - 23.
- FODOR, G., SOTI, F.: Correlation of Valeroidine with S(-)Methoxysuccinic Acid and of Mono- and Ditigloyltropane-3,6-diol with its R(+)Antimer. Tetrahedron Lett. 29 (1964) 1917 - 1921.
- FOWLER, M.W.: Process Stragadies for Plant Cell Cultures. Trends Biotechnol. 4 (1986) 214 - 219.
- FRENCH, D.I., GIBSON, M.R.: The Effect of Glutamic Acid on Datura tatula L. Root Cultures. J. Pharm. Sci. 46 (1957) 151-155.
- FRESHNEY, R.I.: Culture of Animal Cells. Alan R. Liss Inc. New York (1983).
- GADAMER, J.: Die Beziehungen des Hyoscyamins zu Atropin und des Scopolamins zu i-Scopolamin. Arch. Pharm. 239 (1901) 294 - 333.
- GALFRE, G., MILSTEIN, C.: Preparation of Monoclonal Antibodies: Strategies and Procedures. Meth. Enzym. 73 (1981) 3-46.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp. Cell. Res. 50 (1968) 151 - 158.
- GARVE, R., LUCKNER, M., VOGEL, E., TEWES, A., NOVER, L.: Growth, Morphogenesis and Cardenolide Formation in Long-Term Cultures of Digitalis lanata. Planta Med. 40 (1980) 92 - 103.
- GEFTER, M.L., MARGULIE, S., SCHARFF, M.D.: A Simple Method for Polyethylene Glycol Promoted Hybridization of Mouse Myeloma Cells. Som. Cell Gen. 3 (1977) 231 - 236.
- GEIGER, L.: Ueber einige giftige organische Alkalien. Annalen der Pharmazie 7 (1833) 269 - 280.
- GEIGER, L., HESSE, K.: Darstellung des Atropins. Annalen der Pharmazie 5 (1833 a) 43 - 81.
- GEIGER, L., HESSE, K.: Fortgesetzte Vesuche über Atropin. Annalen der Pharmazie 6 (1833 b) 44 - 65.

- GERLICH, W., STAMM, B.: Erfahrungen mit einem Enzymimmunoassay zum Nachweis von Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). In: Enzymimmunoassay. Grundlagen und praktische Anwendung. Vogt, W. (Hrsg.) Thieme Stuttgart (1978) 61 - 66.
- GIBSON, C.A., YOUNKEN, H.W.: Biosynthesis of Tropic Acid in Datura innoxia. J. Pharm. Sci. 56 (1967) 854 - 857.
- GODING, J.W.: Use of Staphylococcal Protein A as an Immunological Reagent. J. Immunol. Meth. 20 (1978) 241 - 253.
- GODING, J.W.: Antibody Production by Hybridomas. J. Immun. Meth. 39 (1980) 285 - 308.
- GODING, J.W.: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press London (1983).
- GRIFFIN, W.J.: The Isolation of 6-Hydroxyhyoscyamine from a Duboisia Hybrid. Naturwissenschaften 62 (1975) 97.
- GRIFFIN, W.J.: Organisation and Metabolism of Exogenous Hyoscyamine in Tissue Cultures of a Duboisia Hybrid. Naturwissenschaften 66 (1979) 58.
- GRIFFIN, W.J., BRAND, H.P., DARE, J.G.: Analysis of Duboisia myoporoides R.Br. and Duboisia leichhardtii F.Muell. J. Pharm. Sci. 64 (1975) 1821 - 1825.
- GUPTA, M.P., GIBSON, M.R.: Protein-Alkaloid Relationship in Datura stramonium var. tatula. J. Pharm. Sci. 61 (1972) 1257 - 1262.
- HAAIJMAN, J.J., DEAN, C., KRÖSE, C.J.M., COOLEN, J., RADL, J.: Monoclonal Antibodies in Immunocytology: A Jungle Full of Pitfalls. Immunology Today 5 (1984) 56 - 58.
- HAMMER, W.: Neue Arzneistoffe 1985. Dt. Apoth. Ztg. 126 (1986) 1197.
- HAMON, N.W.: Metabolism of Tritiated Atropine in Datura innoxia. Lloydia 34 (1971) 199-203.
- HANKS, J.H., WALLACE, R.E.: Relation of Oxygen and Temperature in the Preservation of Tissues by Refrigeration. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 71 (1949) 196 - 200.

- HARTMANN, T., WITTE, L., OPRACH, F., TOPPEL, G.:
Reinvestigation of the Alkaloid Composition of Atropa belladonna Plants, Root Cultures, and Cell Suspension Cultures. *Planta Med.* (1986) 390 - 395.
- HASHIMOTO, T., YAMADA, Y.: Scopolamine Production in Suspension Cultures and Redifferentiated Roots of Hyoscyamus niger. *Planta Med.* 47 (1983) 195 - 199.
- HASHIMOTO, T., YAMADA, Y.: Hyoscyamine 6 β -Hydroxylase, a 2-Oxo-glutarate-Dependent Dioxygenase, in Alkaloid-Producing Root Cultures. *Plant Physiol.* 81 (1986) 619 - 625.
- HASHIMOTO, T., YUKIMUNE, Y., YAMADA, Y.: Tropane Alkaloid Production in Hyoscyamus Root Cultures. *J. Plant. Physiol.* 124 (1986) 61 - 75.
- HEGNAUER, R.: Chemotaxonomische Betrachtungen. 5. Mitteilung. Die systematische Bedeutung des Alkaloidmerkmals. *Planta Med.* 6 (1958) 1 - 34.
- HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 6. Birkhäuser Basel Stuttgart (1973) 403 - 452.
- HESS, K., WAHL, O.: Die Konstitution des Scopolamins und Scopolins. Der Hoffmannsche Abbau des Scopolins (VI. Mitteilung über das Scopolin). *Ber. Dt. Chem. Ges.* 55 (1922) 1979 - 2025.
- HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 2. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart New York (1984).
- HESSE, O.: Zur Kenntnis einiger Solanaceenalkaloide. *Ann.* 271 (1892) 100 - 126.
- HIRAOKA, N., TABATA, M.: Alkaloid Production by Plants Regenerated from Cultured Cells of Datura innoxia. *Phytochemistry* 13 (1974) 1671 - 1675.
- HOFMAN, P.J., FORSYTH, C., VAN STADEN, J.: A Radioimmunoassay for Dihydrozeatin and Dihydrozeatin Riboside, and its Application to a Study of the in vitro Metabolism of Dihydrozeatin by Soybean Callus. *J. Plant Physiol.* 121 (1985) 1 - 12.

- HOOGENRAAD, N., HOOGENRAAD, J., HELMAN, T.: The Effect of Pre-Injection of Mice With Pristane on Ascites Tumor Formation and Monoclonal Antibody Production. *J. Immunol. Meth.* 61 (1983) 317 - 320.
- HORGEN, P.A., NAKAGAWA, C.H., IRVIN, R.T.: Production of Monoclonal Antibodies to a Steroid Plant Growth Regulator. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62 (1984) 715-721.
- HUNTER, M.M., MARGOLIES, M.N., JU, A., HABER, E.: High-Affinity Monoclonal Antibodies to the Cardiac Glucoside, Digoxin. *J. Immunol.* 129 (1982) 1165 - 1172.
- HURN, B.A.L., CHANTLER, S.M.: Preparation of Immunoglobulin Fractions from Whole Serum. *Meth. Enzym.* 70 (1980) 124 - 125.
- HURN, B.A.L., LANDON, J.: Antisera for Radioimmunoassay. In: *Radioimmunoassay Methods*. Kirkham, K.E., Hunter, W.M. (eds.) Edinburgh and London (1971) 121 - 142.
- JAMES, W.O.: Alkaloids in the Plant. In: *The Alkaloids*, Vol. I. Manske, R.H.F., Holmes, H.L. (eds.) Academic Press New York (1950) 64 - 68.
- JINDRA, A., LEBLOVA, S., SIPAL, Z., CIHAK, A.: Beitrag zur Kenntnis der Biosynthese von Tropanalkaloiden. *Planta Med.* 8 (1960) 44 - 48.
- JINDRA, A., STABA, E.J.: *Datura* Tissue Cultures: Arginase, Transaminase and Esterase Activities. *Phytochemistry* 7 (1968) 79 - 82.
- JOURDAN, P.S., MANSELL, R.L., WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for the *Citrus* Bitter Principle, Naringin, and Related Flavonoid-7-O-neohesperidosides. *Planta Med.* 44 (1982) 82 - 86.
- JOURDAN, P.S., WEILER, E.W., MANSELL, R.L.: Naringin Levels in *Citrus* Tissues. I. Comparison of Different Antibodies and Tracers for the Radioimmunoassay of Naringin. *Plant Physiol.* 77 (1985) 896 - 902.
- KACZKOWSKI, J., SCHÜTTE, H.R., MOTHES, K.: Die Rolle des Acetats in der Biosynthese der Tropanalkaloide. *Biochim. Biophys. Acta* 46 (1961) 588 - 594.

- KAMADA, H., OKAMURA, N., SATAKE, M., HARADA, H., SHIMOMURA, K.: Alkaloid Production by Hairy Root Cultures in Atropa belladonna. Plant Cell Reports 5 (1986) 239 - 242.
- KENNET, R.H., MC KEARN, T.J., BECHTOL, K.D. (EDS.): Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum Press New York London (1982).
- KIBLER, R., NEUMANN, K.-H.: Alkaloidgehalte in haploiden und diploiden Blättern und Zellsuspensionen von Datura innoxia. Planta Med. 35 (1979) 354 - 359.
- KITAGAWA, T., AIKAWA, T.: Enzyme Coupled Immunoassay of Insulin Using a Novel Coupling Reagent. J. Biochem. 79 (1976) 233 - 236.
- KITAMURA, Y., MIURA, H., SUGII, M.: Alkaloid Composition and Atropine Esterase Activity in Callus and Differentiated Tissues of Duboisia myoporoides R.Br. Chem. Pharm. Bull. 33 (1985) 5445 - 5448.
- KOELEN, K.J., GROSS, G.G.: Partial Purification and Properties of Tropine Dehydrogenase from Root Cultures of Datura stramonium. Planta Med. 44 (1982) 227 - 230.
- KOHEN, F., LICHTER, S., ESHHAR, Z., LINDNER, H.R.: Preparation of Monoclonal Antibodies Able to Discriminate Between Testosterone and 5 α -Dihydrotestosterone. Steroids 39 (1982) 453 - 459.
- KÖHLER, G.: Immunoglobulin Chain Loss in Hybridoma Lines. Proc. natn. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2197 - 2199.
- KÖHLER, G., LEFKOVITS, I., PERNIS, B.: Immunological Methods. Academic Press New York (1979).
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C.: Continous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. Nature 256 (1975) 495 - 497.
- KOLOSSA, E.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Inhaltsstoffen in Nicotianapflanzen und -zellkulturen. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München (1983).
- KONDRAT, R.W., COOKS, R.G., MCLAUGHLIN, J.L.: Alkaloids in Whole Plant Material: Direct Analysis by Kinetic Energy Spectrometry. Science 199 (1978) 978 - 980.

- KURZ, W.G., CONSTABEL, F.: Aspects Affecting Biosynthesis and Biotransformation of Secondary Metabolites in Plant Cell Cultures. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 2 (1985) 105-118.
- LADENBURG, A.: Die natürlich vorkommenden mydriatisch wirkenden Alkaloide. *Ann.* 206 (1881) 274 - 307.
- LANDSTEINER, K.: The Specificity of Serological Reactions. New York (1945).
- LARKIN, P.J., SNOWCROFT, W.R.: Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60 (1981) 197 - 214.
- LEETE, E.: The Alkaloids of Datura. In: Blakeslee. The Genus Datura. Avery, A.S., Satina, S., Rietsema, J. (eds.) Ronald Press Company New York (1959) 48 - 56.
- LEETE, E.: Biogenesis of Tropic Acid and Related Studies on the Alkaloids of Datura stramonium. *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 612 - 614.
- LEETE, E.: Stereospecific Incorporation of Ornithine into the Tropic Moiety of Hyoscyamine. *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 55 - 57.
- LEETE, E.: Biosynthesis of Alkaloids. In: Biosynthesis, Vol. 3. Geissmann, T.A. (ed.) Burlington House London (1975) 113 - 180.
- LEETE, E., KOWANKO, N., NEWMARK, R.A.: Use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance to Establish That the Biosynthesis of Tropic Acid Involves an Intramolecular Rearrangement of Phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6826 - 6830.
- LEETE, E., LOUDON, M.L.: Biogenesis of Tropic Acid. Origin of the Hydroxy Methyl Group. *Chem. Ind. (London)* (1961) 1405 - 1406.
- LEETE, E., LOUDON, M.L.: Diskussionsbeitrag zur Biosynthese der Tropasäure beim 3. Internationalen Symposium "Biochemie und Physiologie der Alkaloide", Halle, 24.-27. Juni 1965. *Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol.* 3 (1966) 538 - 539.
- LEETE, E., LUCAST, D.H.: Loss of Tritium During the Biosynthesis of Meteloidine and Scopolamine from [N-Methyl-¹⁴C, 6 β , 7 β -³H₂]-Tropine. *Tetrahedron Lett.* 38 (1976) 3401 - 3404.

- LEETE, E., MARION, L., SPENCER, I.D.: Biogenesis of Hyoscyamine. *Nature* 174 (1954) 650 - 651.
- LEFKOVITS, I., WALDMANN, H.: Limiting Dilution Analysis of Cells in the Immune System. Cambridge University Press Cambridge (1979).
- LEHTOLA, T., HUHTIKANGAS, A., VIRTANEN, R.: Application of Radioimmunoassay to the Quantitation of Hyoscyamine in Plant Material. *Planta Med.* 45 (1982) 237 - 239.
- LIEBISCH, H.W., BHAVSAR, G.C., SCHALLER, H.J.: Tropic Acid Synthesis in vivo and in vitro. In: Biochem. Physiol. Alkaloide, Int. Symp., 4th 1969. Mothes, K. (ed.) Akademie-Verlag Berlin (1972) 233 - 237.
- LIEBISCH, H.W., RADWAN, A.S., SCHÜTTE, H.R.: Biosynthesis of Tropane Alkaloids. X. Formation of Cuscohygrine. *Ann.* 721 (1969) 163 - 167.
- LIEBISCH, H.W., SCHÜTTE, H.R.: Ornithine-Derived Alkaloids. In: Biochemistry of Alkaloids. Mothes, K., Schütte, H.R., Luckner, M. (eds.) Dt. Verlag der Wissenschaften Berlin (1985) 106 - 127.
- LINDENMANN, A.: Chemie der Tropan-Verbindungen. *Planta Med.* 2 (1961) 317 - 339.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 100 - 127.
- LITTLEFIELD, I.W.: Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in vitro and their Presumed Recombinants. *Science* 145 (1964) 709 - 710.
- LIU, Y.-L., XIE, F.-Z.: Study on the Alkaloids of Physochlaina physaloides G.Don. Yao Hsueh Pao 14 (1979) 497 - 501.
- LO, M.M.S., TSONG, T.Y., CONRAD, M.K., STRITTMATTER, S.M., HESTER, L.D., SNYDE R, S.H.: Monoklonal Antibody Production by Receptor-Mediated Electrically Induced Cell Fusion. *Nature* 310 (1984) 792 - 794.
- LOEBBORG, U.: Monoclonal Antibodies: Production and Maintenance. W. Heinemann Medical Books London (1982).

- LOEVBORG, U.: Guide to Solid Phase Immuno Assays. A/S Nunc Roskilde Dänemark (1984).
- LOUDON, M.L., LEETE, E.: The Biosynthesis of Tropic Acid. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962a) 1510 - 1511.
- LOUDON, M.L., LEETE, E.: Further Studies on the Biosynthesis of Tropic acid. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962b) 4507-4509.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) 265 - 275.
- LUANRATANA, O., GRIFFIN, W.J.: Alkaloid Biosynthesis in a Duboisia Hybrid. J. Nat. Prod. 45 (1982) 551 - 556.
- LUCKNER, M., DIETRICH, B.: Die Regulation des Sekundärstoffwechsels. In: Biogene Arzneistoffe. Czygan, F.-C. (Hrsg.) Vieweg Braunschweig (1984) 45 - 59.
- MAGGIO, E.T.: Enzymes as Immunochemical Labels. In: Enzyme-Immunoassay. Maggio, E.T. (ed.) CRC Press Boca Raton Florida (1980) 53 - 70.
- MANDAVA, N., FODOR, G.: Configuration of the Ring Nitrogen in N-Oxides and the Conformation of Tropanes. Part XVIII. Canadian J. Chem. 46 (1968) 2761 - 2766.
- MANO, Y., NABESHIMA, S., OHKAWA, H., MATSUI, C.: Characteristics of Hairy Roots of Scopolia japonica Induced by Agrobacterium rhizogenes. In: Abstracts of the Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan (1985) 600.
- MANSELL, R.L., WEILER, E.W.: Radioimmunoassay for the Determination of Limonin in Citrus. Phytochemistry 19 (1980) 1403 - 1407.
- MEIN, A.: Ueber die Darstellung des Atropins in weissen Kristallen. Annalen der Pharmazie 6 (1833) 67 - 72.
- MERCK, Reagenzien Diagnostika Chemikalien. Darmstadt (1985).
- MERTENS, R.: Herstellung und Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Pflanzenhormone. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1985) .

- MERTENS, R., DEUS-NEUMANN, B., WEILER, E.W.: Monoclonal Antibodies for the Detection and Quantitation of the Endogenous Plant Growth Regulator, Abscissic Acid. *FEBS Lett.* 160 (1983) 269 - 272.
- MERTENS, R., EBERLE, J., ARNSCHIEDT, A., LEDEBUR, A., WEILER, E.W.: Monoclonal Antibodies to Plant Growth Regulators. II. Indole-3-acetic Acid. *Planta* 166 (1985) 389 - 393.
- METZ, H., LANG, H.: Verfahren zur Züchtung von differenzier-tem Wurzelgewebe. Deutsche Patentschrift 1216000 (1964).
- MITRA, G.C.: Atropine Production and Growth of Excised Belladonna Root Cultures. *Ind. J. Exp. Biol.* 10 (1972) 217 - 218.
- MITRA, G.C.: Effects of Amino Acids on Growth of Excised Belladonna Root Cultures and on their Atropine Synthesis. In: Proc. Natl. Symp. Plant Tissue Culture, Genet. Manipulation Somatic Hybrid. Plant Cells. Rao, P.S. (ed.) Bombay (1980) 380 - 387.
- MIYAHARA, M., NAKAMURA, H., HAMAGUCHI, Y.: Colcemid Treatment of Myeloma Prior to Cell Fusion Increases the Yield of Hybridomas Between Myeloma and Splenocyte. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 124 (1984) 903 - 908.
- MOORE, G.E., GERNER, R.E., FRANKLIN, H.A.: Culture of Normal Human Leucocytes. *J.A.M.A.* 199 (1967) 519 - 524.
- MÖSSNER, E., BOLL, M., PFLEIDERER, G.: Purification of Human and Bovine Alkaline Phosphatases by a Affinity Chromatography. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 361 (1980) 543 - 549.
- MOTHES, K., SCHÜTTE, H.R., LUCKNER, M.: Biochemistry of Alkaloids. Dt. Verlag der Wissenschaften Berlin (1985).
- MÜLLER, R.: Calculation of Average Antibody Affinity in Antihapten Sera from Data Obtained by Competitive Radioimmunoassay. *J. Immunol. Meth.* 34 (1980) 345 - 352.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 16 (1962) 473 - 497.
- MUTSCHLER, E.: Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1986).

- NABESHIMA, S., MANO, Y., OHKAWA, H.: Production of Tropane Alkaloids by Hairy Root Cultures of Scopolia japonica. (1986) in Vorbereitung.
- NEUMANN, K.H., BARZ, W., REINHARD, E. (eds.): Primary and Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. Springer Berlin Heidelberg (1985).
- O'DONOVAN, D.G., KEOGH, M.F.: Role of Hygrine in the Biosynthesis of Cuscohygrine and Hyoscyamine. J. Chem. Soc. C (1969) 223 - 226.
- OHASHI, M., MORISHIMA, I., OKADA, K., YONEZAWA, T.: ¹H Nuclear Magnetic Resonance Contact Shifts of Some Tropanes. J. Chem. Soc., Chem. Comm. (1971) 34 - 35.
- OKSMAN-CALDENTY, K.-M., STRAUSS, A.: Somaclonal Variation of Scopolamine Content in Protoplast-Derived Cell Culture Clones of Hyoscyamus muticus. Planta Med. (1986) 6 - 12.
- PARHAM, P.: Monoclonal Antibodies against HLA Products and their Use in Immunoaffinity Purification. Meth. Enzym. 92 (1983) 110 - 138.
- PEARN, J.: Corked up: Clinical Hyoscine Poisoning with Alkaloids of the Native Corkwood, Duboisia. Med. J. Austr. 2 (1981) 422 - 423.
- PESHKOV, V.A.: Dynamics of the Content of Individual Alkaloids in Utricularia physalis. Lekarstv. Syr'evye Resursy Irkutskoi Obl., Irkutskii Gos. Med. Inst., Sb. (1965) 78 - 81 (Zitiert nach: Chemical Abstracts 64 (1966) 13088 f).
- PETERS, J.H., BAUMGARTEN, H., SCHULZE, M.: Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo (1985).
- PETIT, A., DAVID, C., DAHL, G.A., ELLIS, J.G., GUYON, P., CASSE-DELBART, F., TEMPE, J.: Further Examination of the Opine Concept: Plasmids in Agrobacterium rhizogenes Cooperate for Opine Degradation. Mol. Gen. Genet. 190 (1983) 204 - 214.

- PETIT, A., DELHAYE, S., TEMPE, J., MOREL, G.: Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en evidence d'une relation biochimique specifique entre les souches d'Agrobacterium tumefaciens et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiolog. Veg.* 8 (1970) 205 - 213.
- PFISTER, J.R.: Convenient Synthesis of N-Noratropine. *J. Org. Chem.* 43 (1978) 4373 - 4374.
- PFITZNER, U., ZENK, M.H.: Immobilization of Strictosidine-Synthase from Catharanthus Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine. *Planta Med.* 46 (1982) 10-14.
- RAFFAUF, R.F.: A Handbook of Alkaloids and Alkaloid-Containing Plants. Wiley-Interscience New York London Sydney Toronto (1970).
- RAJ BHANDARY, S.B., COLLIN, H.A., THOMAS, E., STREET, H.E.: Root, Callus, and Cell Suspension Cultures from Atropa belladonna and Atropa belladonna cultivar lutea. *Ann. Botany* 33 (1969) 647 - 656.
- REINHARD, E., ALFERMANN, A.W.: Biotransformation by Plant Tissue Cultures. In: Advances in Biochemical Engineering Plant Cell Cultures. Fischer, C.A. (ed.) 16 (1980) 49-83.
- RICHTER, E.: Der nacherlebte Hexensabbat. Zu Will-Erich Peuckerts Selbstversuch mit Hexensalben. In: Forschungsfragen unserer Zeit, Sachgebiet 7 (1960) 97 - 100.
- ROBINSON, R.: A Synthesis of Tropinone. *J. Chem. Soc.* 111 (1917) 762 - 768.
- ROMEIKE, A.: Über die Mitwirkung des Sprosses bei der Ausbildung des Alkaloidspektrums II. Epoxydbildung beim Hyoscyamin durch Datura ferox L. *Flora* 143 (1956) 67-86.
- ROMEIKE, A.: Über die Mitwirkung des Sprosses bei der Ausbildung des Alkaloidspektrums II. Bildungsstätte und Biogenese des Scopolamins in Datura ferox L. *Flora* 148 (1959) 306 - 320.
- ROMEIKE, A.: Bisherige Ergebnisse auf dem Gebiet der Biogenese der Tropanalkaloide. *Pharmazie* 15 (1960a) 655 - 658.
- ROMEIKE, A.: Über ein Zwischenprodukt bei der Epoxidierung von Hyoscyamin in der lebenden Pflanze. *Naturwissenschaften* 47 (1960b) 64 - 65.

- ROMEIKE, A.: Die Rolle von Spross und Wurzel bei der Umwandlung des Hyoscyamins in verschiedenen Datura-Arten. Planta Med. 8 (1960c) 491 - 495.
- ROMEIKE, A.: Über das Vorkommen von 6-Hydroxyhyoscyamin in Datura. Naturwissenschaften 49 (1962) 281.
- ROMEIKE, A.: Tropane Alkaloids - Occurrence and Systematic Importance in Angiosperms. Bot. Notiser 131 (1978) 85-96.
- ROMEIKE, A., FODOR, G.: Biogenesis of Hyoscyamine in Datura stramonium. Tetrahedron Lett. 22 (1960) 1 - 4.
- ROUTIER, J.B., NICKELL, L.G.: US Patent Nr. 2 747 334 (1956).
- RUNGE, F.: Neueste phytochemische Entdeckungen. Berlin (1820) 78.
- RUNGE, F.: Sur la base narcotique de la belladonne. Annales de Chimie et de Physique 27 (1824) 32 - 35.
- SACHS, L.: Angewandte Statistik. 6. Auflage. Springer Berlin Heidelberg New York Tokyo (1984) 299 - 322.
- SAFFORD, W.E.: Synopsis of the Genus Datura. J. Washington Acad. Sci. 11 (1921) 173 - 189.
- SANKAWA, U., SUNG, C.K., HAN, B.H., AKIYAMA, T., KAWASHIMA, K.: Radioimmunoassay for the Determination of Ginseng Saponin, Ginsenosid Rg1. Chem. Pharm. Bull. 30 (1982) 1907 - 1910.
- SATO, F., YAMADA, Y.: High Berberine-Producing Cultures of Coptis japonica Cells. Phytochemistry 23 (1984) 281-285.
- SCHEURLIN, M., BITTIGER, H., AMMANN, B.: Simple Radioligand Binding Assay for the Determination of Urinary Scopolamine. J. Pharm. Sci. 73 (1984) 561 - 563.
- SCHÖPF, C., LEHMANN, G., ARNOLD, W.: Die Synthese von Naturstoffen, insbesondere von Alkaloiden, unter physiologischen Bedingungen und ihre Bedeutung für die Frage der Entstehung einiger pflanzlicher Naturstoffe in der Zelle. IV. Die Synthese der Tropaalkaloide und des Pseudopelletierins. Angew. Chem. 50 (1937) 783-786.
- SCHULTZE, H.E., HEREMANS, J.F.: Molecular Biology of Human Proteins. Nature and Metabolism of Extracellular Proteins. Elsevier Amsterdam (1966) 236.

- SHAKESPEARE, W.: Hamlet, Prince of Danemarke. London (1601)
1. Akt, 5.Szene. Zitiert nach: Shakespeares Werke. In
deutscher Sprache durch Schlegel/Tieck. Balser, K.
(Hrsg.) Standard Verlag Hamburg (1958).
- SHIMOMURA, K., SATAKE, M., KAMADA, H.: Production of Useful
Secondary Metabolites by Hairy Roots Transformed with
Ri Plasmid. In: Abstracts of VI. International Congress
of Plant Tissue and Cell Culture. Somers, D.A.,
Gengenbach, B.G., Biesboer, D. D., Hackett, W.P.,
Green, C.E. (eds.) Minneapolis (1986) 250.
- SHULMAN, M., WILDE, C.D., KÖHLER, G.: A Better Cell Line for
Making Hybridomas Secreting Specific Antibodies. Nature
276 (1978) 269 - 270.
- SLEUMER, H.O.: Olacaceae. New York Botanical Garden New York
(1984).
- SMITH, K.O., GEHLE, W.D.: Magnetic Transfer Device for Use in
Solid Phase Radioimmunoassays and Enzyme-Linked Immuno-
sorbent Assays. J. Infect. Dis. 136 Suppl. (1977) 329-336.
- SOLT, M.L., DAWSON, R.F., CHRISTMAN, D.R.: Biosynthesis of
Anabesine and of Nicotine by Excised Root Cultures of
Nicotiana glauca. Plant Phys. 35 (1960) 887 - 894.
- SPANO, L., WULLEMS, G.L., SCHILPEROORT, R.A., CONSTANTINO,
P.: Hairy Root. In vitro Growth Properties of Tissues
Induced by Agrobacterium rhizogenes on Tobacco. Plant
Science Letters 23 (1981) 299 - 305.
- STABA, J., JINDRA, A.: Datura Tissue Cultures: Production of
Minor Alkaloids from Chlorophyllous and Nonchloro-
phyllous Strains. J. Pharm. Sci. 57 (1968) 701 - 704.
- STÄHLI, C., STÄHLIN, T., MIGGIANO, V., SCHMID, J., HÄRING,
P.: High Frequencies of Antigen Specific Hybridomas:
Dependence on Immunisation Parameters and Prediction by
Spleen Cell Analysis. J. Immunol. Meth. 32 (1980) 297-304.
- STENBERG, V.I., NARAIN, N.K., SINGH, S.P.: Carbon-13 Magnetic
Resonance Spectra of the Tropane Alkaloids : Cocaine
and Atropine. J. Heterocyclic. Chem. 14 (1977) 225-226.
- STIENSTRA, T.M.: Formation of Mydriatic Alkaloids in Excised
Root Cultures of Datura stramonium Grown on a
Completely Synthetic Nutrient. Proc. Kon. Ned. Akad.
Wetensch. Ser. C 57 (1954) 584 - 593.

- STOHS, S.J.: Production of Scopolamine and Hyoscyamine by Datura stramonium L. Suspension Cultures. J. Pharm. Sci. 58 (1969) 703 - 705.
- TABATA, M., HIRAOKA, N.: Variation of Alkaloid Production in Nicotiana rustica Callus Cultures. Physiol. Plant. 38 (1976) 19 - 23.
- TABATA, M., YAMAMOTO, H., HIRAOKA, N., KONOSHIMA, M.: Organization and Alkaloid Production in Tissue Cultures of Scopolia parviflora. Phytochemistry 11 (1972) 949-955.
- TANAKA, N., HAYAKAWA, M., MANO, Y., OHKAWA, H., MATSUI, C.: Infection of Turnip and Radish Storage Roots with Agrobacterium rhizogenes. Plant Cell Reports 4 (1985) 74-77.
- TEPFER, D.: Transformation of Several Species of Higher Plants by Agrobacterium rhizogenes: Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype. Cell 37 (1984) 959 - 967.
- TONNESEN, M.: Chemical and Biological Methods for Determination of Small Concentrations of Atropine and Allied Alkaloids in Forensic Analyses. Acta Pharmacol. (Kbh) 4 (1948) 186 - 198.
- TSUDA, K., OHKI, E., NOZOE, S.: Steroid Studies. XXXVII. An Aromatization Reaction of a Cross-Conjugated Dienone Systeme with Zinc. 2. A Aromatization of Steroidal 1,4-Die n-3-one and 1,4,6-Trien-3-one Systeme with Zinc. J. Org. Chem. 28 (1963) 783 - 785.
- TYLER, Jr., V.E., GRÖGER, D.: Investigation of the Alkaloids of Amanita Species. I. Amanita muscaria. Planta Med. 12 (1964) 334 - 339.
- TYLER, V.E.: Plant Drugs in the Twenty-First Century. Econ. Bot. 40 (1986) 279 - 288.
- UFFELIE, O.F.: Het Kweken van Plantaaridge weefsels in vitro. Alcaloid-vorming in de wortels van Hyoscyamus en Datura. Pharm. Tijdschr. Belgie 28 (1951) 65 - 71.
- VAN WEEMEN, B.K., SCHUURS, A.H.W.M.: Immunoassay Using Anti-gen-Enzyme Conjugates. FEBS Lett. 15 (1971) 232 - 236.

- VERZAR-PETRI, G., SOTI, F., HORVATH, L.: Biosynthesis of Scopolamine on the Basis of Radioactive Examinations in Datura innoxia. Herba Hung. 13 (1974) 77-90.
- VIRTANEN, R., KANTO, J., IISALO, E.: Radioimmunoassay for Atropine and 1-Hyoscyamine. Acta pharm. tox. 47 (1980) 208 - 212.
- VOGEL, E., LUCKNER, M.: Distribution of Cardenolides in Digitalis lanata. Planta Med. 41 (1981) 161 - 165.
- VOGT, W.: Enzymimmunoassay. Grundlagen und praktische Anwendung. Thieme Verlag Stuttgart (1978).
- WAGNER, H.: Rauschgift-Drogen. Springer Berlin Heidelberg New York (1970).
- WAGNER, H.: Pharmazeutische Biologie. 2. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. G. Fischer Verlag Stuttgart New York (1980).
- WALLER, G.R., NOWACKI, E.K.: Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press New York (1978) 71.
- WALLSCHLÄGER, D.: Monoklonale Antikörper gegen (S)-Tetrahydroprotoberberin Oxidase (STOX) und Peroxidase (POD) aus Pflanzen. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (1984).
- WEILER, E.W.: Radioimmunoassays for the Differential and Direct Analysis of Free and Conjugated Abscissic Acid in Plant Extracts. Planta 148 (1980) 262 - 272.
- WEILER, E.W.: An Enzyme-Immunoassay for cis-(+)-Abscissic Acid. Physiol. Plant 54 (1982) 510 - 514.
- WEILER, E.W.: Immunoassay of Plant Constituents. Biochem. Soc. Trans. 11 (1983) 485 - 495.
- WEILER, E.W.: Immunoassay of Plant Growth Regulators. Ann. Rev. Plant Physiol. 35 (1984) 85 - 95.
- WEILER, E.W., JOURDAN, P.S., CONRAD, W.: Levels of Indole-3-acetic Acid in Intact and Decapitated Coleoptiles as Determined by a Specific and Highly Sensitive Solid-Phase Enzyme Immunoassay. Planta 153 (1981a) 561 - 571.

- WEILER, E.W., KRÜGER, H., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Steroidal Alkaloid Solasodine and Related Compounds in Living Plants and Herbarium Specimens. Planta Med. 39 (1980) 112 - 124.
- WEILER, E.W., MANSELL, R.L.: Radioimmunoassay of Limonin Using a Tritiated Tracer. J. Agric. Food Chem. 28 (1980) 543 - 545.
- WEILER, E.W., STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Scopolamine. Phytochemistry 20 (1981b) 2009 - 2016.
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of Digoxin and Related Compounds in Digitalis lanata. Phytochemistry 15 (1976) 1537 - 1545.
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Iodinated Digoxin Derivatives with Improved Reactivity and Stability, for Use in Radioimmunoassay. Clin. Chem. 25 (1979) 44 - 47.
- WEILER, E.W., ZENK, M.H.: Autoradiographic Immunoassay (ARIA). Meth. Enzym. 73 (1981) 394 - 406.
- WELLS, A.A., REEDER, G.S.: The Fruit of the Celestrus scandens and Solanum dulcamarum. Chem. News 96 (1908) 199 - 200.
- WEST, Jr., F.R., MIKA, E.S.: Synthesis of Atropine by Isolated Roots and Root-Callus Cultures of Belladonna. Botan. Gaz. 119 (1957) 50 - 54.
- WESTEKEMPER, P., WIECZOREK, U., GUERITTE, F., LANGLOIS, N., LANGLOIS, Y., POTIER, P., ZENK, M.H.: Radioimmunoassay for the Determination of the Indole Alkaloid Vindoline in Catharanthus. Planta Med. (1980) 24 - 37.
- WHITE, F.F., NESTER, E.W.: Hairy Root: Plasmid Encodes Virulence Traits in Agrobacterium rhizogenes. J. Bacteriol. 141 (1980) 1134 - 1141.
- WHITE, R.P.: The Cultivation of Animal and Plant Cells. New York (1954) 191 - 194.
- WIECZOREK, U.: Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Opiumalkaloiden in Papaver-Pflanzen und -Zellkulturen. Dissertation, Ludwigs-Maximilians-Universität München (1985).

- WIERMANN, R.: Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. In: The Biochemistry of Plants. Vol. 7. Conn, E. (ed.) Academic Press New York London Toronto Sydney San Francisco (1981) 85 - 116.
- WILLSTÄTTER, R.: Ueber die Constitution des Tropins. Ber. Dt. Chem. Ges. 30 (1897) 2679 - 2719.
- WILLSTÄTTER, R.: Ueber die Constitution der Spaltungsprodukte von Atropin und Cocain. Ber. Dt. Chem. Ges. 31 (1898) 1534 - 1553.
- WILLSTÄTTER, R.: Umwandlung von Tropidin in Tropin. Ber. Dt. Chem. Ges. 34 (1901) 3163 - 3165.
- WILLSTÄTTER, R.: Synthese des Tropins. Ann. 326 (1903) 23-42.
- WINK, M., SCHIEBEL, H.M., WITTE, L., HARTMANN, T.: Quinolizidine Alkaloids from Plants and their Suspension Cultures. Planta Med. 44 (1982) 15 - 20.
- WÜRSTEL, G.: Seminar I: Homöopathie. 12. Bundesapothekerkammer-Seminarkongreß. Berchtesgaden. 5. - 11.10.1986. Pharm. Ztg. 131 (1986) 2656 - 2657.
- WURZBURGER, R.J., MILLER, R.L., BOXENBAUM, H.G., SPECTOR, S.: Radioimmunoassay of Atropine in Plasma. J. Pharmacol. Exp. Therap. 203 (1977) 435 - 441.
- YALOW, R.S.: Radioimmunoassay: A Probe for the Fine Structure of Biological Systems. Science 200 (1978) 1236 - 1245.
- YAMADA, Y., ENDO, T.: Tropane Alkaloid Production in Cultured Cells of Duboisia leichhardtii. Plant Cell Reports 3 (1984) 186 - 188.
- YAMADA, Y., HASHIMOTO, T., YUKIMUNE, Y.: Tropane Alkaloid Biosynthesis in Root Cultures: Purification and Characterisation of Hyoscyamine-6 β -hydroxylase. Vortrag auf dem VI. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, 3. - 8. August 1986, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA.

- ZENK, M.H.: Pflanzliche Zellkulturen in der Arzneimittelforschung. In: Fortschrittsberichte aus Naturwissenschaft und Medizin. Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte. 112. Versammlung Mannheim 1982. Staab, H.A., Gerok, W., Markl, H., Martienssen, W., Gibian, H. (Hrsg.) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1982) 145 - 162.
- ZENK, M.H., DEUS, B.: Natural Product Synthesis by Plant Cell Cultures. In: Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (ed.) Tokyo (1982) 391-393.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1977) 27 - 43.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of Morinda citrifolia. Planta Med. Suppl. (1975) 79 - 101.
- ZIMMERMANN, U.: Electric Field-Mediated Fusion and Related Electrical Phenomena. Biochim. Biophys. Acta 694 (1982) 227 - 277.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk, der mir freundlicherweise die Bearbeitung des Themas überließ, danke ich an dieser Stelle sehr herzlich. Seine Unterstützung und ständige Anteilnahme am Fortgang der Experimente trugen wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei.

Herrn Dr. S. Jendrzejewsky danke ich für die Aufnahme und Interpretation der Kernresonanzspektren.

Ebenfalls gilt mein Dank allen anderen, die Rat und Tat zum Gelingen der Arbeit beisteuerten. Nicht zuletzt an die Zusammenarbeit mit Frau M. Öttl erinnere ich mich gerne.

Dem Sonderforschungsbereich 145 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn) sei für die finanzielle Unterstützung gedankt. Die Stiftung Volkswagenwerk (Hannover) ermöglichte die Einrichtung des Labors für die Arbeit mit monoklonalen Antikörpern. Empfänger der Finanzmittel war Prof. Dr. M.H. Zenk.

LEBENS LAUF

Am 5. November 1957 wurde ich, Jürgen Wachsmuth, als erstes Kind des Diplom-Ingenieurs Dieter Wachsmuth und seiner Ehefrau Helga, geb. Ruloff, in Darmstadt geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in den Jahren 1964 bis 1968 trat ich in das Asam-Gymnasium in München ein, wo ich im Mai 1977 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Dem Wehrdienst schloß sich ab dem Wintersemester 1978/79 das Studium der Pharmazie an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München an. Nach dem Staatsexamen und dem einjährigen Praktikum in einer öffentlichen Apotheke erhielt ich im Oktober 1983 die Approbation. Im Januar 1984 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. M.H. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Gleichzeitig bin ich am Institut für Pharmazeutische Biologie als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

